

From the Department of Botany, Hokkaido University, Sapporo.

CHROMOSOME STUDIES
ON TRILLIUM KAMTSCHATICUM PALL. AND ITS ALLIES.
XXIV. THE ASSOCIATION OF KINETOCHORES
OF NON-HOMOLOGOUS CHROMOSOMES AT MEIOSIS.

By

HAJIME MATSUURA and MASATAKA KURABAYASHI.

With 10 figures in the text.

(Eingegangen am 20. November 1950.)

It has been several times reported in the papers of this series that bivalents or trivalents in *Trillium* are usually characterized by the association of the kinetochores of homologs. In order to warrant generalization, this is now being substantiated by our co-workers in many other plants including several which have often been utilized in cytological investigations, such as *Fritillaria*, *Allium* and *Lilium*. The resulting data will be published elsewhere in the near future. Even in *Tradescantia*, which is regarded as a balanced heterozygote, the same conditions are sometimes met with (SOEDA, unpublished). From these findings and others, it is now concluded that (i) kinetochores are homologous, irrespective of whether they are of homologous chromosomes or not; (ii) the pairing of chromosomes starts first at the chromatid proper ("genonemata") and after that the kinetochores (essentially "kinetonemata") are paired passively; and (iii) the opening-out likewise commences first at the chromatid proper and later at the kinetochores. On the ground of these new conceptions about the kinetochore, it will not be surprising to see that kinetochores of non-homologous chromosomes happen to pair on some occasions, thus giving rise to unusual multivalents.

The present paper deals with this phenomenon, which will, for the sake of brevity, be referred to hereafter as non-homologous kinetochore association.

Observations.

Since no literature was found about this phenomenon, observations and records seem so far to have been restricted solely to those obtained in our laboratories. The following is an account of our observations on this matter given under separate headings for the two species, *T. Hagae* and *T. kamschaticum*, and in chronological order.

I. *Trillium Hageae* (a triploid species).

1. The first record of this phenomenon was made in 1943 by MATSUURA (No. 18 of this series, see Fig. C) in one pollen mother-cell of *T. Hageae*. In it a trivalent of the A chromosomes and a bivalent of the B chromosomes associate together by means of kinetochore pairing, forming a peculiar pentavalent. At that time this was considered to be due to reciprocal translocation between certain of these chromosome arms.

2. In 1944, several cases of the same phenomenon were recorded by MATSUURA and TAKIZAWA (No. 20 of this series) in the same material.

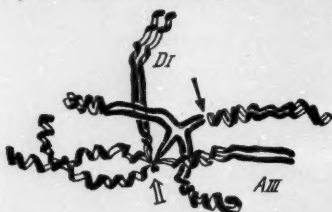


Fig. 1. A case of non-homologous kinetochore association in *T. Hageae*. The chromosome combination is AIII-DI. The AIII is of the K'-type, and it is these paired kinetochores to which the kinetochore of the D univalent is associated. The double arrow indicates the region of association of these kinetochores and the single arrow the unpaired kinetochore of the A. $\times 1560$.

Here the non-homologous kinetochore association was found in the following combinations: AI-CI, BI-EI, AII-EI, CII-DII, CII-DI and probably AIII-DII, one instance of each being encountered. Such frequent occurrence of this sort of association among different chromosomes made us skeptic as to the interpretation based on reciprocal translocation. It was then postulated that some unbalanced conditions of kinetochores due to triploidy may bear a certain causal relationship to the occurrence

of this event, because this sort of association had so far been observed solely in *T. Hageae* which is triploid.

3. In 1947, the junior writer made some observations on the same material. Several plants were put in a green house of about 20° C, when their pollen mother-cells were in an early stage of meiosis. In this material whose meiotic processes were thus accelerated, he found many instances of non-homologous kinetochore association in their cells at the first metaphase. They were: AIII-BII, AII-BII, AII-CII, AII-CI, AI-CI, AIII-DII, AIII*-DI, AII-EII, AII-EI, BII-DII, BII-EII, BI-EI, DII-EII, each once, and CII-DII, twice. These trivalents and bivalents are all of the K type, that is, those in which their three or two kinetochores associate together, excepting one case of the trivalent A, marked above by an asterisk, which is K' III, two of the three kinetochores being paired normally and the remaining chromosome being conjugated by means of a chiasma (Fig. 1).

II. *Trillium kamtschaticum* (a diploid species).

In two seasons (1945 and the following year) several plants of *T. kamtschaticum* were subjected to high temperatures when they were

in late diplotene in the anthers, with the aim of testing whether the present phenomenon is caused by a certain type of kinetochore unbalance, since the occurrence had so far been found in either triploid plants or an

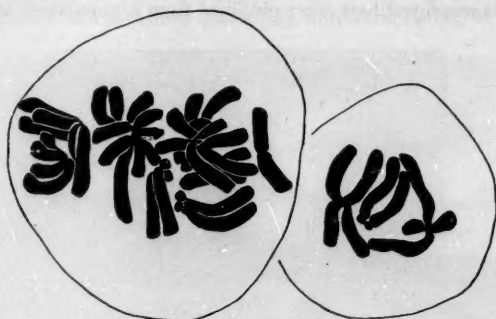


Fig. 2.

Fig. 3.

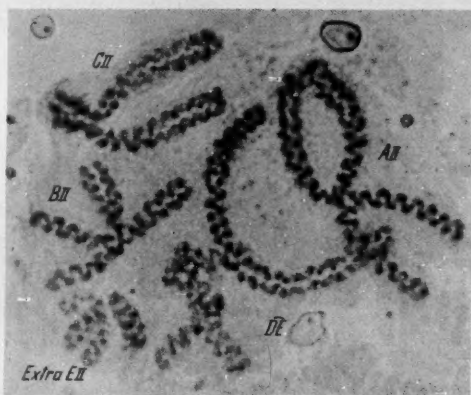


Fig. 4.

Figs. 2-4. Illustrating some cases of numerical aberrations of chromosomes found in pollen mother-cells of *T. kamschaticum* under normal conditions. 2, an autotetraploid cell. 3, a hypoploid cell with only three bivalents, A, C and D. 4, a hyperploid cell having an extra E bivalent in addition, found in a translocated plant. Note the extra E bivalent whose contour and inner structure are somewhat different from the other normal ones, showing reduced condensation of chromosome matrix, reduced property of spiralization of chromonemata and reduced repulsion between the paired chromatids as compared with the other chromosomes in which the separation is already accomplished.

× 1800.

unbalanced translocation plant (No. 25 of this series), or whether by some alteration in the physiological properties of kinetochores during meiosis. The latter might bear some relationship to the effects of

abnormal temperatures, especially on the velocity of meiotic prophase. The data to be presented here were obtained by the junior writer.

Before going further, some remarks may be made on this material. The plants employed here were obtained from a population at Samani,



Fig. 5.

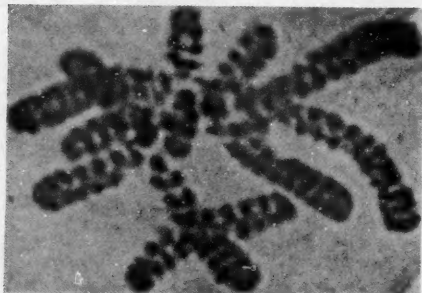


Fig. 6.

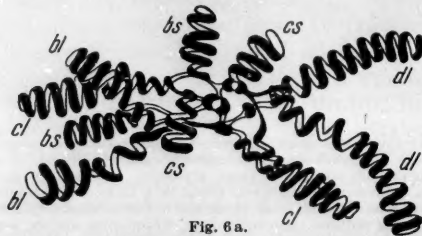


Fig. 6a.

Hokkaido (collected in June, 1944), and a total of twenty three plants was karyologically studied. Excepting two plants (Nos. 1 and 23) which are translocation heterozygotes, they were shown to have the normal complement of five pairs. However, the plants from this locality seem to differ from those of other populations in yielding some abnormal

pollen mother-cells; although very rarely, fragmentation and fusion of chromosomes, both hyper- and hypoploid pollen mother-cells, and tetraploid ones were met with (Figs. 2—4). With respect to numerical aberrations of chromosomes (excepting autotetraploidy), several cases

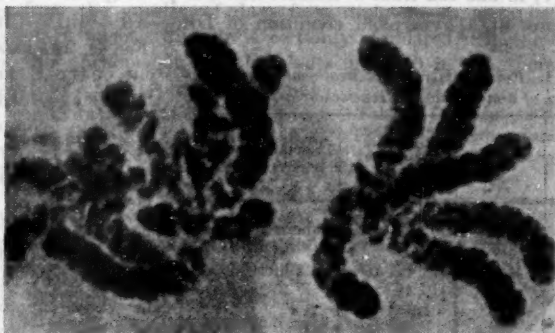


Fig. 7.

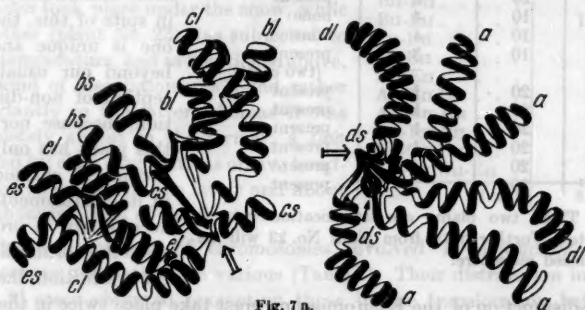


Fig. 7a.

Figs. 5-7. Illustrating some cases of non-homologous kinetochore association found in material of heat treated *T. kamschaticum*. 5, association of AII-DII (from plant No. 4), 6, association of three bivalents, B, C and D (from plant No. 13); 6a, sketch of configuration shown in 6; 7, the complete set of chromosomes in a pollen mother-cell (from plant No. 11), representing two cases of association, AII-DII and BII-CII, and a free bivalent of the E; 7a, diagrammatic drawing of configuration shown in 7. Double arrows indicate regions of non-homologous kinetochore association, and single arrows free kinetochores. $\times 1500$.

were recorded, among which the following five cases permitted an indubitable identification of individual chromosomes: (i) in each of four pollen mother-cells in a group (No. 4 plant), the complement was shown to be $AII + BII + CI + DII + EII$, thus lacking one homolog of the C chromosomes; (ii) in the neighborhood of the above cells on the same slide, one cell showed a configuration involving $AII + BII + DII$

DII + EII, an extra DII taking the place of CII; (iii) in the same plant another cell showed AII + BII + CII + CI + DII, an extra CI taking the place of EII; (iv) in one cell from another plant (No. 2), the complement was AII + CII + DII (Fig. 3), lacking both BII and EII; and (v) in one cell from a translocated \overline{DE} plant (plant No. 23) there was present a hyperploid condition of \overline{DE} + AII + BII + CII + EII

(Fig. 4), an extra bivalent of the E chromosomes being added to the complete complement. It may be presumed that these aberrant complements were due to non-disjunction during archesporial mitoses as evidenced by the case 1 in which the four cells in a group showed the same abnormality. But in spite of this, the last one is unique and far beyond our usual conception of non-disjunction, because normally this plant has only one normal E chromosome in its complement, and accordingly in order to yield the normal E bivalent in addition, the same

Table 1. Relationship of heat treatment to the occurrence of non-homologous kinetochore association.

Plant No.	Temperature °C	Days elapsed from late diplotene to MI days	Presence or absence of association
1 ¹	0	5	none
2	15	2	present
3	20	1	present
4	20	1	present
5	10	3	none
6	10	3	present (only one case)
7	20	2	present
8	10	4	none
9	10	4	none
10	10	3	present (two cases)
11	20	1	present
12	20	1	present
13	20	1	present
14	20	1	present
15	20	1	present
23 ¹	20	2	present

¹ These two plants are translocation heterozygotes. Further data from plant No. 23 will be published elsewhere.

non-disjunction of the E chromosome must take place twice in the same direction. On the basis of chance alone this is improbable. Though we are not yet aware of the exact causation of these abnormalities, they are considered to be worthy of mention because some unknown physiological factors may have been operating, for instance, abnormally high or low viscosity of protoplasm. And in this sense these abnormalities might bear some relation to the phenomenon at issue, i.e., the association of non-homologous kinetochores.

In the present study, sixteen plants among the total twenty three from this population were subjected to high temperatures. The rate of speeding up of meiotic division was measured by the number of days elapsed from the time of initiation of heat stimulus, i.e., late diplotene,

to first metaphase¹. Of them, nine plants were ascertained to have multivalent complexes due to non-homologous kinetochore association (Figs. 5-7). It was, however, very difficult to treat these on a statistical basis, because their frequency was very low. In Table 1, therefore, only the presence or absence of these aberrant forms was marked. Judging from the number of days from diplotene to metaphase, an acceleration of meiotic division is certainly correlated with the occurrence of this phenomenon. In the plants in which it took more than four days to reach metaphase, no such abnormal configuration was detected (plant Nos. 1, 8 and 9), and in those of the three day class, either few or none were recorded (plant Nos. 5, 6 and 10). The remaining one day and two day classes all indicated the occurrence of this abnormality (plant Nos. 2-4, 6, 7, 10-15). In this connection, it may be mentioned that in the two translocation heterozygotes, one (plant No. 1) had been kept in the field and its meiotic divisions took place under the snow, while the other (plant No. 23) was subjected to high temperature, and as mentioned above, this kind of association was found rather abundantly in the latter whereas it was completely absent in the former, a fact verified by close observations on five hundred complete cells of the latter and about two thousand cells of the former.

Table 2. *Combinations of bivalents involved in non-homologous kinetochore association and their frequencies.*

Combinations	Frequencies
Ап-Вп	11
Ап-Сп	12
Ап-Дп	13
Ап-Еп	0
Вп-Сп	7
Вп-Дп	6
Вп-Еп	11
Сп-Дп	3
Сп-Еп	2
Дп-Еп	5
Ап-Вп-Сп	2
Ап-Вп-Дп	5
Ап-Вп-Еп	1
Вп-Сп-Дп	2
Ап-Сп-Дп-Еп	1
Total	81

The combinations of chromosomes involved in non-homologous kinetochore association are various (Table 2). Their distribution in the total 81 cases observed (excepting those in the translocation heterozygote), seems to indicate random assortment of chromosomes, nearly all possible combinations having been found. In addition to the combinations of two bivalents, there were four different combinations of three bivalents and one combination of four bivalents. We expected to meet with the extreme case where all the bivalents of the complement are involved in kinetochore pairing, but failed to detect it in the present material. However its possibility may actually be realized, we believe, in the near future by further studies in a larger scale.

¹ Fixations were made as soon after treatment as the first metaphase was reached. Observations were made on aceto-carmin slides pretreated in various ways, described elsewhere (Nos. 18 and 21 of this series).

With respect to the causation of the present phenomenon, we are not yet in a position to say what forces are operating here. It may however be presumed that there is certain relationship of its occurrence to the acceleration of meiotic processes due to high temperatures, as shown by the above data. In this connection, it is pertinent to mention

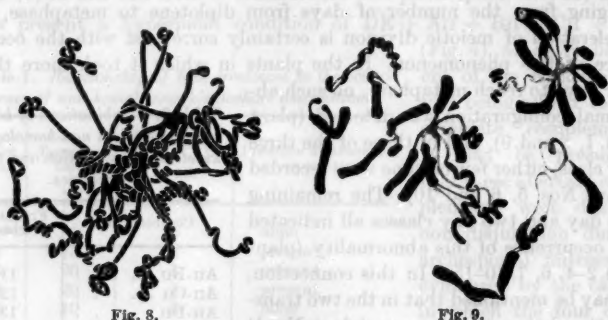


Fig. 8.

Fig. 9.



Fig. 10.

Figs. 8-10. Representing some of effects of high temperature on meiotic chromosomes. These figures were taken from one and the same individual. 8, the chromonemata undergo synizesis and begin to spiralize in an irregular manner. 9 and 10, they come out as separate chromosomes, some of which are bivalents, some univalents and the others multivalents by means of non-homologous kinetochore association (indicated by arrows). Note that some portions of chromosomes undergo incomplete spiralization and are severely stretched out, especially at the kinetochore regions. Perhaps these cells are at a stage corresponding to first metaphase, skipping over diakinesis. $\times 1300$.

here the unpublished work carried out in 1946 by Dr. T. HAGA, one of our co-workers. Several plants of *T. kamtschaticum* which had been collected at Shizunai, Hokkaido, were subjected to 25° C at the time when their pollen mother-cells were in mid-diplotene, immediately after their transfer from a field deeply covered by snow. This sudden change in

temperature seems to have brought about some serious upsets in the time correlation between the various processes responsible for the internal and external mechanics of the chromosomes. First it was noted as an outstanding feature that with the heat stimulus the chromonemata suddenly undergo synizesis and tend to be accelerated in their spiralization. Secondly, the kinetochore-spindle mechanism appears to be upset, the division of kinetochores accelerating in various ways; some cells contain twenty chromatids (monads) irregularly scattered, and others are characterized by ten dyads which also show no regular orientation. The later microsporogenesis takes place in very irregular ways. Since the detailed account of such effects of heat treatment on meiotic division will be given on another occasion, it will be mentioned here only that in cases where the synizesis and spiralization were greatly accelerated, as shown in Fig. 8, some multivalents with chromosomes associated at the kinetochore regions were often met with (Figs. 9 and 10). The identification of the individual chromosomes partaking in these associations could not be made with certainty because the irregularity and incompleteness in the formation of double coiled structure and extreme stretching out of some chromonema parts, especially the kinetochore regions, rendered the comparison of chromosome lengths very difficult. But it is certain that these irregularities are not restricted to any definite chromosomes, but occur in various members of the complement.

The senior writer has obtained further data on this phenomenon in the translocation heterozygote plant No. 23 and in another so-called "sticky" plant. These will be published elsewhere as Nos. 25 and 29, respectively of this series.

Summary and Conclusions.

The above data may be summarized as follows; (i) non-homologous kinetochore association may take place under certain conditions of pollen mother-cells, (ii) no specific attraction exists between any of the pairs of kinetochores, the combination of these pairs being entirely random, and (iii) there seems to be a certain relationship between the non-homologous kinetochore association and the speeding-up of meiotic prophases.

Now some remarks may be made on these findings. First, all these findings verify the principle that the kinetochores are all of the same structure, irrespective of the chromosomes to which they belong; in this sense, they are all homologous to each other. Accordingly if given the opportunity all the kinetochores will be mutually attracted and come together in a single association. This assumption is fully in

accordance with the findings from the translocation heterozygotes (plants Nos. 1 and 23), where whole arms of particular chromosomes are reciprocally translocated (studies Nos. 25 and 26 of this series to be published later). In these plants the four chromosomes, two of which are normal and the other two the translocated ones, usually form a quadruple complex in which all the four kinetochores are associated together. This must imply that in this case non-homologous kinetochores come together obligatorily and passively. In this connection, it is interesting to note further the fact that in the so-called "permanent prophase" nuclei of salivary glands of some *Drosophila* species, all the chromosomes are fused at their kinetochores into one central undifferentiated mass, making a chromocenter. Perhaps this means that in these nuclei there was enough time to bring forth the intimate association of non-homologous kinetochores.

Secondly, the opportunity for such association seems to occur in diplotene, as the above heat experiments indicate¹. Usually there is a second contraction stage at this time, in which all the bivalents of the complement tend to contract together within the nucleus, and it is in this stage that the matrical substances begin to accumulate around kinetochores ("kinetochore matrix", cf. No. 13 of this series). If this accumulation takes place rapidly, the kinetochores of non-homologous chromosomes may be fused together, being included by the common matrical substances and having no time for separating from each other as in normal cases.

Thirdly, there seems to be a certain relationship between the occurrence of this association and the chromosome length. In Table 3, the above data in *T. Hage* and *T. kamschaticum* are rearranged with respect to the pairs of chromosomes involved in the association. If the assortment is purely a matter of chance, each combination is expected to occur in equal frequency. Contrary to this expectation, the combinations involving larger chromosomes seem to occur more often than

Table 3. Combinations of chromosomes involved in non-homologous kinetochore association in *T. Hage* and *T. kamschaticum* (abbreviated as *T. H.* and *T. k.*, respectively).

Material	A-B	A-C	A-D	A-E	B-C	B-D	B-E	C-D	C-E	D-E	Total
<i>T. H.</i>	3	4	3	3	—	1	3	4	—	1	22
<i>T. k.</i>	19	15	19	2	11	14	12	6	3	6	107
Total	22	19	22	5	11	15	15	10	3	7	129
Percentage .	17.1	14.7	17.1	3.9	8.5	11.6	11.6	7.8	2.3	5.4	100.00

¹ According to McCLINTOCK ('33), in *Zea mays* such association of non-homologous kinetochores may occur at pachytene, but it does not continue into the diakinesis stage.

those involving smaller ones, although the data are too few to determine this relation in numerical terms. If this be granted, this may be a matter involving the movement of chromosomes after diplotene. As suggested in the foregoing, the non-homologous kinetochore association takes place during diplotene, perhaps at the second contraction stage, and each chromosome in a complement may differ as to the time of entering into diakinesis, smaller ones being expected to come out from the contraction earlier than larger ones. In other words, larger chromosomes have more chance for associating together as compared with smaller ones.

Fourthly, it may be said that certain unbalanced conditions of the kinetochores in a nucleus may have some influence on the occurrence of this phenomenon. As shown in the above data, this kind of association tends to occur more easily in triploid *Hagae* than in diploid *kamschaticum*. And furthermore, as will be fully shown later, in the translocation heterozygote No. 23, the non-homologous associations involving the kinetochores of the translocation complex (that is, the four paired kinetochores) occur more frequently than those involving the kinetochores of the free bivalents. It may be inferred then that the closely grouped kinetochores exert a greater attraction, though its real nature is yet quite obscure.

In conclusions, it may be said with assurance that the non-homologous kinetochore association is an essentially random phenomenon as to the chromosomes involved in this event, which may however be modified to a certain degree by the unbalanced conditions of the kinetochores in a nucleus and the difference in chromosome size. Their association is brought about in a passive way. This conclusion favors the previous view that in normal bivalents the pairing usually starts at the chromosome ends and that kinetochores do not play a dominant role in initiating such pairing. This supports the view of McCLINTOCK ('33) and is opposed to SMITH and BOOTHROYD ('42) who insist that the kinetochores have an initial advantage in pairing.

Literature cited.

- McCLINTOCK, B.: The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. *Z. Zellforsch.* 19, 191 (1933). — MATSUURA, H.: Chromosome studies on *Trillium kamschaticum* Pall. and its allies XIII, *Cytologia* 11, 369 (1941). — XVIII, *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. ser. V*, 6, 19 (1946); also *Chromosoma* 3, 418 (1949). — XX (with S. TAKIZAWA), *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., ser. V*, 6, 37 (1946). — XXI (with M. KURABAYASHI), *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., ser. V*, 6, 57 (1946). — SMITH, S.G., and E.R. BOOTHROYD: Polarization and progression in pairing. I. Interlocking of bivalents in *Trillium erectum* L. *Canad. J. Res. C* 20, 358 (1942).

From the Department of Botany, Hokkaido University, Sapporo.

CHROMOSOME STUDIES
ON TRILLIUM KAMTSCHATICUM PALL. AND ITS ALLIES.
XXIII. CERTAIN PECULIAR MEIOTIC CONFIGURATIONS.

By

HAJIME MATSUURA.

With 32 figures in the text.

(Eingegangen am 25. Februar 1951.)

During the course of the present series of investigations, several peculiar configurations of bivalents or trivalents were met with, which seem to be significant for some fundamental problems of meiosis. These were occasionally encountered and recorded in various slides studied during the years 1945—1949. In the present paper, I intend to bring together these scattered records and to interpret them on the principles adduced in my earlier papers. These peculiar configurations are like "puzzle" problems to cytologists, the solution of which is dependent on their standpoint concerning the interpretation of the nature of chiasmata and of chromatids composing bivalents or multivalents, and the behavior of kinetochores. They will be of interest in affording some clues to determine which view is right—the chiasmatype theory vs. the neo-two plane theory¹.

Observations.

The configurations to be presented here are those taken from *Trillium Hagae* (3x, $2n=15$), excepting one case—case 8—which was obtained from *T. kamtschaticum* (2x, $2n=10$).

CASE 1.

Material. *T. Hagae* from Shiraoi, Hokkaido. The rhizomes employed were kept during early stages of meiosis in chambers at high temperatures ranging from 18° C. to 26° C., in order to accelerate the velocity of meiosis. The figure in question (Fig. 1) was obtained from an aceto-carmine slide pretreated with 0.1 mol glucose solution for three minutes.

The following configuration, Fig. 1, illustrating the interlocking within a single bivalent—internal interlocking or more simply "intra-locking"—will be of significance as offering a supplementary example

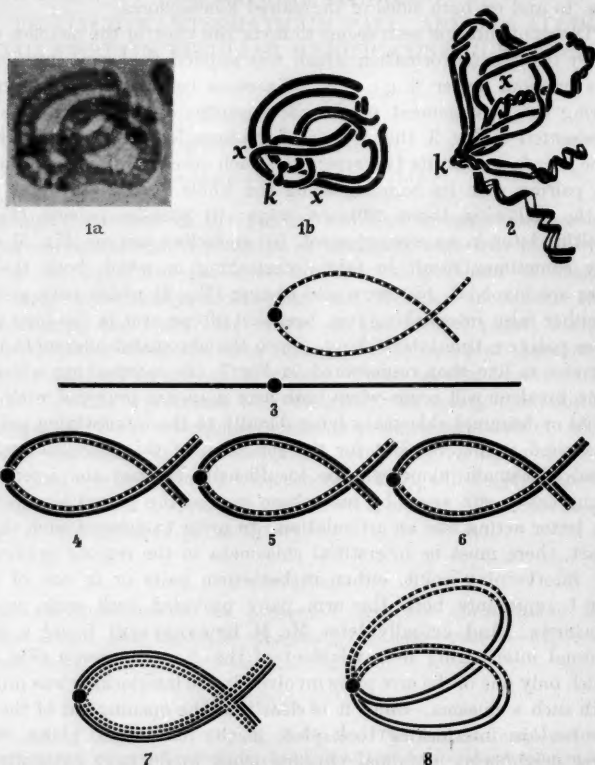
¹ *Acknowledgments.* I wish to express my sincere gratitude to Professor F. SCHRADER of Columbia University for reading and criticizing the manuscripts and facilitating the publication. I am also indebted to Mr. M. KURABAYASHI of my laboratory for use of certain of his slides.

throwing some light on the question of double interlocking which was dealt with elsewhere (No. 17 of this series). In this figure, the two arm pairs of the A bivalent, each forming a terminal chiasma loop, are interlocked with each other, and there are interstitial chiasmata lying close to and on both sides of the paired kinetochores.

The configuration seen seems to favor the view of the neo-two plane theory of chiasma formation which was applied to double interlocking in a previous paper (l. c.). Let us assume here that at the time of pairing the arrangement of the chromosomes in question is like that represented in Fig. 3, that is, one of the homologs, here the A chromosome, bends so that its two arms cross each other. In such a situation, the pairing with its homolog along the whole length may take place in the following three different ways: (i) parallel pairing (Fig. 4), resulting later in no entanglement, (ii) encircling pairing (Fig. 5) which may sometimes result in false interlocking in which both the arm pairs are involved, (iii) crosswise pairing (Fig. 6) which may give rise to either false interlocking (viz. insertion of one arm in the loop of the other pair) or true interlocking. Since the chromatid alignment in the last case is like that represented in Fig. 7, the interlocking within the same bivalent will occur when both arm pairs are provided with interstitial or terminal chiasmata lying distally to the intertwining point, as illustrated in Fig. 8. But for the retention of this interlocking those distal chiasmata alone will be insufficient, because the interlocking might easily slip apart by metaphase around the paired kinetochores, the latter acting like an articulation. In order to prevent such slipping apart, there must be interstitial chiasmata in the regions proximal to the intertwining point, either in both arm pairs or in one of them. Fig. 1 represents both the arm pairs provided with such proximal chiasmata. And actually later Mr. M. KURABAYASHI found a similar internal interlocking in a trivalent of the A chromosomes (Fig. 2), in which only one of the arm pairs involved in the interlocking was provided with such a chiasma. Since it is clear that the opening-out of the loops involved in interlocking took place in the reductional plane, that of these neighboring proximal chiasma loops would have naturally been equational.

Although it is certain that interlocking is a result of the derangement of chromosomes prior to pairing, the problem is whether two loops around an interstitial chiasma can be locked together or not. If the central joint point of self-locked bivalents were a real chiasma, as DARLINGTON claims, this would be taken as an evidence supporting the chiasmatype theory. But the facts clearly indicate that the central connection is due to the paired kinetochores, and hence there remains no doubt about the interpretation based on the neo-two plane theory.

The first case of such internal interlocking was reported as early as 1922 by GELEI in *Dendrocoelum*. Later GAIRDNER and DARLINGTON (1931) discussed the possibility of such interlocking in *Campanula*, and actually some cases were found by KOLLER (1936) in *Dasyurus* and by



Figs. 1-8. Representing internal interlocking in *T. Hagae* (Figs. 1 and 2) and diagrammatically illustrating the way of its formation (Figs. 3-8). 1 self-locked A trivalent; 2 self-locked A bivalent; 3 supposed arrangement of a chromosome pair prior to pairing; 4-6 three possible ways of pairing along the whole length of chromosomes; 7 chromatid arrangement in a pairing condition like Fig. 6; 8 internal interlocking resulting from it which may however split apart by metaphase by means of rotating movement of the loops.
K kinetochores; x interstitial chiasmata.

SMITH and BOOTHROYD (1942) in *Trillium*, and these authors all adopted the chiasmatype theory to interpret them. With respect to double interlocking or interlocking of similar implication, several cases were demonstrated; by MATHER (1935) in *Lilium regale*, by UPCOTT (1936)

in *Eremurus spectabilis*, by BEAL (1936) in *Lilium elegans*, by STRAUB (ex OEHLKERS 1937) in *Gasteria strigosa*, by BENNETT (1938) in *Fritillaria chitralensis*, by SMITH and BOOTHROYD (1942) in *Trillium erectum*, and by MATSUURA (1944) in *Trillium Tschonoskii*. Of these, the case described by SMITH and BOOTHROYD is the only one in which the chromatids and the position of kinetochores could be traced and demonstrated to be true chiasma interlocking. In spite of close investigation, however, I could not find any case of such true chiasma interlocking in *T. Tschonoskii*; instead I found four cases in which the two arms of bivalents—the A bivalents in all cases which are the longest within the complement—were locked by loops of other bivalents around the paired kinetochores. It is noteworthy that recently I could record a similar case in *T. kamtschaticum*, in which one arm pair of the A bivalents was locked with two adjacent loops of the B. Here too the central connection of the B was the paired kinetochores. Thus the data so far recorded in my laboratories—seven cases in total including both double interlocking and internal interlocking—show no exception to the principles previously adopted by me.

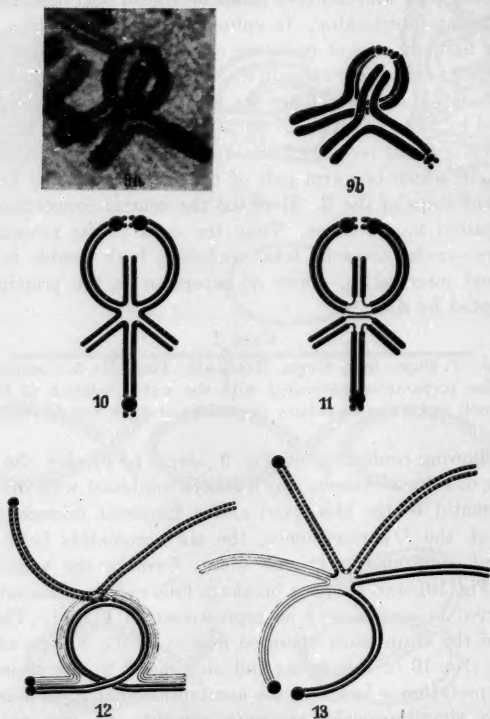
CASE 2.

Material. *T. Hage* from Shoya, Hokkaido. Plant No. 5. Control. From an aceto-carmin preparation pretreated with the mixed solution of KCl (1 mol), NaNO_3 (1 mol) and water in volume percentage of 27, 8 and 65 respectively, for 2 minutes.

The following configuration, Fig. 9, seems to involve the very rare occurrence of a triple chiasma which is here combined with the formation of a chromatid bridge (dikinetic) and a fragment (akinetic). In this trivalent of the D chromosomes, the six chromatids have originally opened out equationally at one point, forming the so-called triple chiasma (Fig. 10), and chiasma breakage followed by chromatid reunion has occurred in such a way as represented in Fig. 11. The mode of reunion of the chromatids operated here is of the Y type as described elsewhere (No. 19 of this series and also case 3 in the present paper). This interpretation is based on the assumption that three homologs may sometimes simultaneously associate together at the pairing stage (cf. Fig. 7, Plate I in No. 18 of this series).

The above configuration can thus easily and simply be interpreted on my views of chromatid assortment and crossing-over. How would it be when one adopts the chiasmotype theory? On the ground of this theory, such a multiple chiasma is assumed to result from terminalisation of preexisting interstitial chiasmata and furthermore the formation of bridges and fragments is interpreted on the assumption that the material employed is an inversion heterozygote and there occurred a single crossing-over in the inversion segment. I wonder, however,

how these two hypotheses could be reconciled with each other. First, it must be pointed out that here too, as in cases previously reported, the whole configuration is symmetrical, that is, the fragment is composed of two equal parts. On the inversion theory this implies that the crossing-over took place in the middle point of the inversion segment.



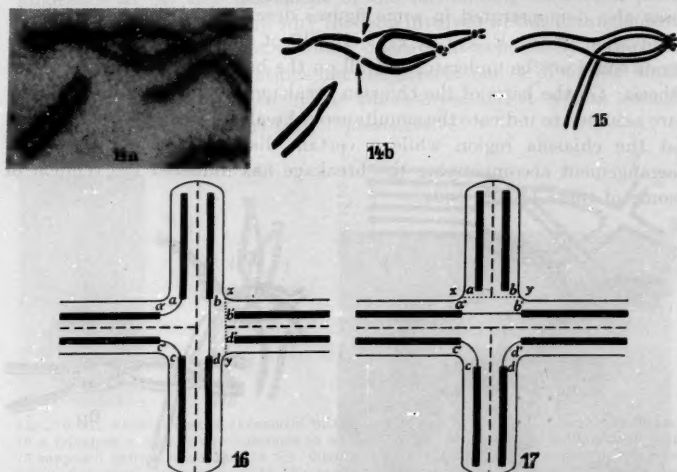
Figs. 9-13. 9 triple chiasma in a D trivalent of *T. Hagei* combined with chiasma breakage. 10 supposed arrangement of chromatids prior to chiasma breakage. 11 chromatid reunion after breakage. 12 and 13 interpretation based on the inversion hypothesis; 12 pairing situation and 13 opened-out configuration.

However there is no reason to assume that the crossing-over is liable to occur at the middle point of the inversion segment. Secondly, even if this be granted, however; how could the fragment be paired with the chromatids from the third chromosome which should not have been involved in the crossing-over? Thirdly, even if the additional assumption be made that another chiasma was formed between this chromosome

and the inversion segment at a point adjacent to the former chiasma, as represented in Fig. 12, the resulting opened-out configuration will be such as shown in Fig. 13 and never like that under discussion.

CASE 3.

Material. *T. Hagae* from Shiraoi, Hokkaido. Control. From an aceto-carmin preparation pretreated with the mixed solution of KCl (1 mol), NaNO_2 (1 mol) and water in volume percentage of 25, 10 and 65 respectively, for 2 minutes and a half.



Figs. 14-17. Illustrating the "reversed Y" type of chiasma breakage. 14 chromatid breakage and reunion at a chiasma region in a bivalent of the D (*T. Hagae*). Note broken ends indicated by arrows. The upper broken point is less conspicuous than the lower one, probably indicating a more advanced stage in restoration after breakage. 15 supposed configuration prior to chiasma breakage. 16 diagrammatical representation of chromatid reunion giving rise to the Y type (reproduced from Fig. E 4 in No. 19 of this series). 17 reunion giving rise to the "reversed Y" type. Note that the mechanism of reunion is just the same as in Fig. 17, differing only in cutting off a distal free arm portion instead of a proximal one.

In a previous paper (No. 19 of this series), I described three types of chiasma breakage, that is, the X, Y and O types. As to the Y type, it was assumed that the reunion of the broken ends b and d, Fig. 16, took place in one arm before the division of matrix develops inwards over the chiasma region, and the secondary division of matrix, xy, cut off one proximal arm. I must say here, however, that another possibility escaped my notice, that is, the possibility of reunion of either a'-b' or c'-d', cutting off thus one free distal arm (Fig. 17). This possibility would seem, however, to be of rarer occurrence, because the division of matrix is assumed to be initiated usually from the distal ends.

The configuration as represented in Fig. 14 is just what is expected from this sort of chiasma breakage. This type is essentially the same as the Y type, although the resulting configuration is apparently quite different. The present type may then be called the "reversed Y" type. It must be noted in this configuration that there still remain broken ends in the two chromatids (as indicated by arrows in Fig. 14). The existence of such broken ends in the chromatids which are superficially not related to the formation of the chromatid loop and the fragment was also demonstrated in some figures described earlier (especially in a bivalent of the E, Fig. 6, Pl. 7, No. 19 of this series). These broken ends could not be understood at all on the basis of the inversion hypothesis. On the basis of the chiasma breakage hypothesis however, they are assumed to indicate the simultaneous breakage of the four chromatids at the chiasma region while a certain distortion in the chromatid arrangement accompanying the breakage has hindered the reunion of some of these broken ends.

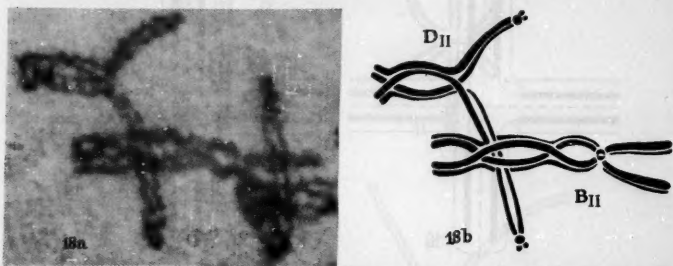


Fig. 18. Representing chromatid interlocking found in *T. Hagae*. The D is caught by the chromatids of the B.

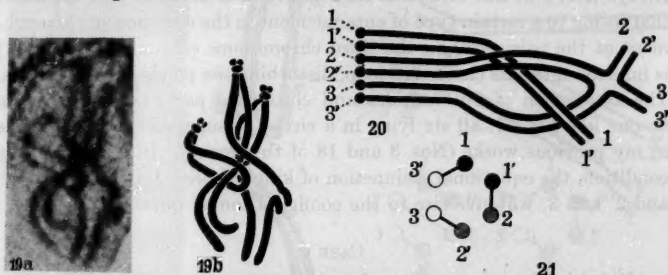
CASE 4.

Material. The same as in the foregoing case.

This case (Fig. 18) represents an example of chromatid interlocking; one arm of the D bivalent is passing through each of two pairs of chromatids of a chiasma loop of the B bivalent. It is seen that the arrested portion of the D arm shows unpaired and extremely elongated chromatids, and the arresting chiasma loop of the B can not open out normally wide. Such a configuration would be untenable on the chiasmatype theory which claims that the paired chromatids are always in the sister relationship, but it may be quite simply interpreted on the basis of the neo-two plane theory by assuming that (i) one of the D chromosomes having overlapped at a certain point one of the B chromosomes prior to pairing was caught during pairing of the B in such a way that the D arm protruded through them, and (ii) the surrounding B chromosome

pair has opened out in the equational plane. This second assumption is possible but of rare occurrence, because as previously suggested (cf. Fig. 2 in No. 18 of this series), the encircling chromatid pairs usually undergo the opening-out in the reductional plane, owing to non-pairing at the entanglement point. However the rare possibility is conceivable that there is an equational opening-out in this portion. And in this case, the chromosome involved in this penetration will impose some hindrance to the free movement of the surrounding chromatid pairs. This seems to be the reason why the loop involved in this entanglement, as seen in this figure, is not so widely opened-out as normally is the case.

Several other configurations like the present one or of similar implications have been obtained in our laboratories, but it will be enough to cite the present case as their representative.



Figs. 19-21. Another case of chromatid interlocking found in X-rayed material (*T. Hagae*). 19 a trivalent of the D chromosomes in which one arm is caught by a chromatid loop. 20 supposed pairing situation. In this diagram only long arms are represented; left-hand circles represent kinetochores. 21 the mode of disjunction of paired kinetochores and chromatid parts—all equational in this case.

CASE 5.

Material. *T. Hagae* from Shiraoi, Kokkaido. X-rayed at prophase of PMCs (January 15, 1948); 100r (19.5r per minute), filtered by Cu and Al filters, at the distance of 30 cm. The following configuration was obtained from an aceto-carmin preparation pretreated with the mixed solution of KCl (1 mol), NaNO_3 (1 mol) and water in volume percentage of 27, 8 and 65 respectively, for 2 minutes.

The present case represents another type of chromatid interlocking in which only one chromatid pair is involved. In this trivalent of the D chromosomes, Fig. 19, one arm portion is caught by a chromatid loop of another chromosome. The existence of such a chromatid loop could not be explained on the chiasmata theory.

It is clear that the chromatid loop and the fragment (lying on the right lower side in this figure) are those induced by irradiation, and the asymmetrical figure of the fragment indicates that the induced aberration is due to "two hits". Furthermore it may be inferred that the chromatid loop in question is one that resulted from the equational

opening-out. The protruding chromatid pair is the arm portion which opened out in the reductional plane. Considered in this way, the three kinetochore pairs are those which all disjoined equationally.

Now let us assume the original pairing situation of these three chromosomes to be that represented by Fig. 20. In this, all the kinetochores are completely associated and all the chromatids of these chromosomes are also paired throughout a certain length—a possibility which was already in paper No. 18 of this series. Two of the chromosomes (composed of chromatids 2 and 2', and 3 and 3' respectively) have each one chromatid break which was followed by a reunion of the nature of a reciprocal translocation—a possibility already demonstrated in the previous work on chromosome aberrations induced by X-rays (No. 9 of this series, cf. its Fig. 10). Furthermore it is assumed that owing to a certain type of entanglement in the chromosome arrangement at the pairing stage, the third chromosome (chromatids 1 and 1') is inserted into this chromatid loop, disturbing the pairing in this region. The association of kinetochores and chromatid parts is considered to be one like Fig. 21, all six lying in a circle—a suggestion already made in my previous works (Nos. 3 and 18 of this series). In such a pairing condition, the equational disjunction of kinetochores, 1 and 3', 1' and 2, and 2' and 3, will give rise to the configuration at question.

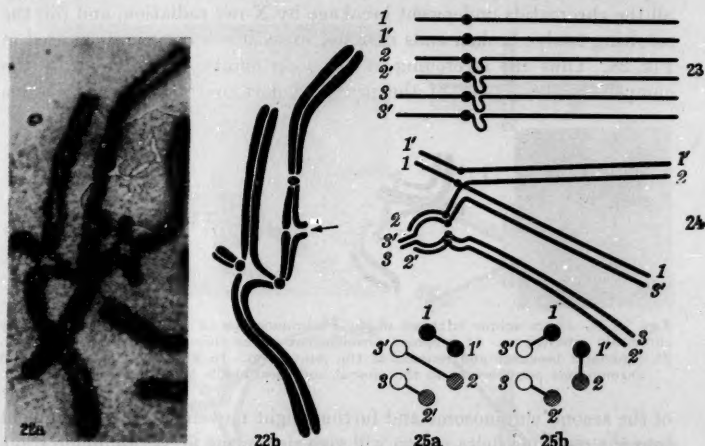
CASE 6.

Material. The same as in case 2.

The following configuration of a trivalent of the C chromosomes shows a peculiar feature owing to a certain heteromorphism in its components. Such karyotypic polymorphism in *T. Hageae*, especially of the C chromosomes, has already been demonstrated in our laboratories (No. 20 of this series). Although in the present individual, the analysis of its somatic chromosomes has not yet been made, it was inferred from meiotic metaphase configurations of the C chromosomes that the three homologs are different from each other; the first one is of normal length, the second has in its long arm an extra heterochromatic part of a certain length in the neighborhood of the kinetochore, and the third has the short arm slightly longer than the short arms of the other two, and the long arm similar to the second one (Fig. 23).

Based on the chiasmatype theory, the present configuration, Fig. 22, would be taken as favoring the view that the kinetochores have disjoined reductionally and, besides a crossing-over in the long arms, a single crossing-over took place between the kinetochore and the differential part of the short arm, the resulting chiasma having been terminalized and giving rise to a symmetrical "lateral" chiasma (cf. DARLINGTON 1937, p. 261). This would be unobjectionable, of course, if the dis-

junction of kinetochores were always reductional, but as shown by the foregoing trivalent cases, they may divide equationally as well. If it be granted that the three homologs associate together along their whole length, including the kinetochores (Fig. 23), and at diplotene, the chromatids of the short arms open out reductionally in chromosome 1 and equationally in chromosomes 2 and 3,—the chromatid assortment being 1-1', 2-3' and 2'-3—and those of the long arms separate all



Figs. 22–25. 22 a case of the so-called “lateral” chiasma (indicated by arrow) in a trivalent of the heteromorphic C chromosomes (*T. Hageae*). 23 supposed pairing situation of the three homologs which differ from each other in the possession of an extra part in the short arm of the third chromosome and of an extra part each in the long arm of the second and the third chromosome. 24 a mode of two-by-two opening-out. 25 diagrammatical illustration of the assortment of chromatids in the same configuration in the short arms (Fig. a) and in the long arms (Fig. b).

equationally in their homologous parts—the assortment being 1'-2, 2'-3 and 1-3'—(Figs. 24 and 25), one will get the configuration presented here.

CASE 7.

Material. The same X-rayed material as in case 5.

The complexities of the present configuration of a D trivalent stem from the fact that one of the chromatids is dikinetid and its monokinetid partner is slightly longer than the normal chromatid, and that through these chromatids a long fragment is penetrating (Fig. 26). It is clear that here we are dealing with some unique translocation processes, in which all the four chromatids of these two chromosomes are involved, instead of only two chromatids as in more usual cases. For such breakage

and recombination of the chromatids, it will be necessary to assume a special arrangement of the chromosomes. The simplest interpretation of the present configuration will then be found by assuming that (i) prior to pairing, the first chromosome had a loop in its long arm, and the second chromosome happened to protrude through this loop at the time of the pairing movement thus making the pairing in 'the loop' region impossible (Fig. 27), (ii) at the point of union of these chromosomes, all the chromatids underwent breakage by X-ray radiation, and (iii) the resulting twelve broken ends reunited in such a way as is illustrated in Fig. 28. Thus the stretching of the loop chromatid followed by the compelled opening-out of the proximal part of the sister chromatids



FIGS. 26-28. 26 a unique trivalent of the D chromosomes (*T. Hagee*), characterized by chromatid interlocking. 27 supposed arrangement of the chromosomes prior to pairing. 28 chromatid breakage and reunion at the joint point. In Figs. 27 and 28, the third chromosome non-relevant to the present complications is omitted in drawings.

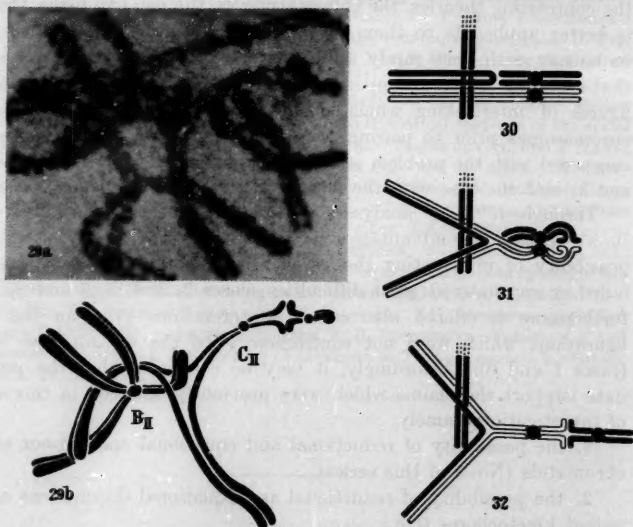
of the second chromosome and further slight movement of the fragment into the resulting delta region will give rise to the present configuration. Breakage (and rejoining) of the chromatids, however, might not necessarily have been caused by X-radiation; it might equally be caused by the same mechanism as the chiasma breakage (No. 19 of this series). Although we are not here dealing with a chiasma, the point of union in question is essentially equivalent to a chiasma in the sense that all the chromatids are embedded in a common matrix. Actually such a possibility was recently demonstrated by me in a case of "sticky" chromosomes (to be published as No. 29 of this series). It might be said for the present case that the latter procedure seems rather more probable, for the recombination of the broken chromatids did not occur at random as expected from X-ray induced breakage, but took place along the planes of the division of matrix as in the case of chiasma breakage.

CASE 8.

Material. Rhizomes of *T. kamtschaticum* (from Shizunai) were X-rayed on September 28th, 1949, under the following conditions: 140 KV, 4 mA, 100 cm distance through Al and Cu filters for 6.3 minutes. The dosage was about 20r. They were put in a green house of about 20° C on January 4th, 1950, and came to the first metaphase in PMCs on 16th of the same month. The present configuration

was obtained in an aceto-carmin preparation pretreated with the solution of NaNO_2 (1 mol), H_2COONa (1 mol), KCl (1 mol) and water mixed in 1:1, 0.4, 2.0 and 7.0 cc respectively, for 2 minutes.

Like the foregoing cases, the present configuration affords another example of chromatid interlocking. The chromosomes involved here are the B and the C bivalents; the long arms of the latter open out in the form of Y, certainly due to breakage and recombination of the



Figs. 29-32. 29 a case of chromatid interlocking found in X-rayed material of *T. kamschaticum*. 30-32 illustrating how such a figure arose (see text).

chromatids by X-radiation. Through this delta region one of the short arms of the B is penetrating (Fig. 29). Such a Y-shaped opening-out was previously demonstrated by us (No. 9 of this series) and interpreted on the assumption that one of the chromosomes underwent a lesion prior to pairing, and equational opening-out took place in its distal part after pairing. Keeping this in mind, the whole procedure leading to this configuration may be pictured as follows: (i) prior to pairing, one of the B chromosomes was lying across one of the C chromosomes near its lesion point (Fig. 30), (ii) the rejoined chromatids of the C opened out in the equational plane, thus causing the B arm to penetrate through the paired chromatids of each arm (Fig. 31), and (iii) accompanied by a wider opening-out and subsequent contraction of the rejoined chromatids, one of the entanglements near the distal

end of the B arm slipped off (Fig. 32). The last assumption is somewhat elaborate, but it would be justified where no proper interpretation can not be found on the basis of the chiasmatype theory.

Summary and Conclusion.

In the present paper, several unusual configurations of bivalents and trivalents were dealt with for the purpose of determining which of the contrasting theories, the chiasmatype vs. the neo-two plane theory, is better applicable to them. The configurations presented here are to be met with very rarely and are worthy of mention in the sense that each represents an opportunity in a thousand. Most of them are figures of interlocking which results from certain derangements of chromosomes prior to pairing (cases 1, 4, 5, 7 and 8); two cases are concerned with the problem of the so-called "inversion bridge" (cases 2 and 3) and one case with the nature of the "lateral" chiasma (case 6).

Throughout these analyses the neo-two plane theory has been shown to have the advantage over the chiasmatype theory; it gave a possibility of interpreting the cases where the latter theory entirely failed or encountered great difficulties (cases 2, 3, 4, 5, 7 and 8), and furthermore it offered alternative interpretations even for the configurations which were not contradictory to the chiasmatype views (cases 1 and 6). Accordingly, it may be concluded that the present data support the claims which were previously adduced in this series of investigation, namely,

1. the possibility of reductional and equational opening-out of the chromatids (No. 3 of this series),
2. the possibility of reductional and equational disjunctions of the paired kinetochores (l. c.),
3. the possibility of pairing along the whole length of chromosomes, including kinetochores, even in trivalents, although less frequent than in bivalents (No. 18 of this series), and
4. the possibility of breakage and reunion of chromatids at the chiasma region (No. 19 of this series).

The first three involve the neo-two plane theory; and the last one utilizes the spiral theory of crossing-over (Nos. 12 and 22 of this series).

Literature cited.

- BEAL, J. M.: Double interlocking of bivalent chromosomes in *Lilium elegans*. Bot. Gaz. **97**, 678 (1936). — BENNETT, E. S.: The origin and behaviour of chiasmata. XIV. *Fritillaria chitralensis*. Cytologia **8**, 443 (1938). — DARLINGTON, C. D.: Recent Advances in Cytology. Second edition. London 1937. — GAIRDNER, A. E., and C. D. DARLINGTON: Ring-formation in diploid and polyploid *Campanula persicifolia*. Genetica **13**, 113 (1931). — GELEI, J.: Weitere Studien über die Oogenese des *Dendrocoelum lacteum*. III. Die Konjugationsfrage der Chromosomen

in der Literatur und meine Befunde. Arch. Zellforschg 16, 299 (1922). — KOLLER, P. C.: The origin and behaviour of chiasmata. XI. *Dasyurus* and *Sarcophilus*. Cytologia 7, 82 (1936). — MATHER, K.: Meiosis in *Lilium*. Cytologia 6, 354 (1933). — MATSUURA, H.: (1) Chromosome studies on *Trillium kamschaticum* Pall. and its allies. III. The mode of chromatid disjunction at the first meiotic metaphase of the PMC. Cytologia 8, 142 (1937). — (2) Chromosome studies on *Trillium kamschaticum* Pall. and its allies. XII. The mechanism of crossing-over. Cytologia 10, 390 (1940). — (3) Chromosome studies on *Trillium kamschaticum* Pall. and its allies. XVII. A study of chromosome interlocking in *T. Tschonoskii* Maxim. Cytologia 13, 369 (1944). — (4) Chromosome studies on *Trillium kamschaticum* Pall. and its allies. XIX. Chromatid breakage and reunion at chiasmata. J. Fac. Sci., Hokkaido Imp. Univ., Ser. V, 6, 27 (1946). — (5) Chromosome studies on *Trillium kamschaticum* Pall. and its allies. XVIII. The rôle of the kinetochore in trivalent formation. Chromosoma 3, 418 (1949). — (6) Chromosome studies on *Trillium kamschaticum* Pall. and its allies. XXII. Critical evidence of the spiral theory of crossing-over. Chromosoma 3, 431 (1949). — MATSUURA, H., and T. HAGA: Chromosome studies on *Trillium kamschaticum* Pall. and its allies. IX. Chromosome aberrations induced by X-ray treatment. J. Fac. Sci., Hokkaido Imp. Univ., Ser. V, 6, 1 (1946). — MATSUURA, H., and S. TAKIZAWA: Chromosome studies on *Trillium kamschaticum* Pall. and its allies. XX. A statistical analysis on the chromosome association in a triploid species, *T. Hagei*. J. Fac. Sci., Hokkaido Imp. Univ., Ser. V, 6, 37 (1946). — OEHLKERS, F.: Die zytologischen Grundlagen des genetischen "crossing-over". Ber. dtsch. bot. Ges. 55, 96 (1937). — UPCOTT, M.: The origin and behaviour of chiasmata. XII. *Eremurus spectabilis*. Cytologia 7, 118 (1936). — SMITH, S. G., and E. R. BOOTHROYD: Polarization and progression in pairing. I. Interlocking of bivalents in *Trillium erectum* L. Canad. J. Res. C 20, 358 (1942).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

UNTERSUCHUNGEN AM PACHYTÄN NORMALER
UND RÖNTGENBESTRAHLTER POLLENMUTTERZELLEN
VON SOLANUM LYCOPERSICUM*.

Von

WERNER GOTTSCHALK.

Mit 20 Textabbildungen.

(Eingegangen am 31. Januar 1951.)

Inhalt.	Seite
A. Einleitung	298
B. Material und Methode	299
C. Experimenteller Teil	299
I. Die Analyse des Pachytäns von <i>Solanum lycopersicum</i>	299
a) Hilfsmittel für die Identifizierung der Pachytänchromosomen	300
b) Die Beschreibung der Einzelchromosomen des Genoms	302
c) Die Variabilität der Baupläne der Pachytänchromosomen	312
II. Das Genom von <i>Solanum lycopersicum</i> im Hinblick auf eine Polyploidie des Objektes	315
III. Die Untersuchungen des Pachytäns nach der Einwirkung von Röntgenstrahlen	316
a) Das Pachytän nach der Bestrahlung prämeiotischer Ruhekerne	317
b) Die Bestrahlung des Pachytäns	320
c) Die Lage der Bruchstellen im Chromosom	323
D. Theoretischer Teil	328
I. Die Variabilität der Pachytänchromosomen	328
II. Primär- und Sekundäreffekt in der Meiosis	330
III. Die Frage nach der Spezifität der Mutationsauslösung	334
IV. Die Entstehung spontaner Chromosomenmutationen	337
Zusammenfassung	339
Literatur	340

A. Einleitung.

Für die Untersuchung der Wirkungsweise mutagener Einflüsse ist es notwendig, die behandelten Zellkerne in frühen Teilungsstadien nach der Einwirkung zu analysieren, um den Einfluß sekundärer Veränderungen des chromosomalen Bildes der Aberrationen, wie sie vor allem im Verlauf einer Kernteilung auftreten können, möglichst auszuschalten. Für Untersuchungen dieser Art ist das Stadium des Pachytäns in der Prophase der Meiosis besonders geeignet, weil hier die Chromosomen sehr langgestreckt, noch wenig spiralisiert und trotzdem bereits übersichtlich im Kernraum gelagert sind. Durch die Paarung

* Dissertation der Naturw.-mathem. Fakultät der Universität Freiburg i. Br.

der Homologen wird dabei die Erfassung und Lokalisierung von Umbauten der Chromosomen bedeutend erleichtert. In diesem Zusammenhang ist es aber erwünscht, wenn Bau und Struktur der Chromosomen des Objektes näher bekannt sind.

Von diesen Überlegungen ausgehend, sollte zunächst versucht werden, die von OHLENDORF (1944) und BROWN (1949) begonnene Identifizierung der Chromosomen von *Solanum lycopersicum* weiterzuführen. Bei der deutlichen Längsgliederung der Chromosomen dieses Objektes in euchromatische Enden, einen heterochromatischen Mittelteil und eine meist deutlich sichtbare Insertionsstelle war es dann möglich, bei der Untersuchung der röntgenbehandelten Pollenmutterzellen besonders auf die Bruchverteilung in diesen 3 Regionen zu achten und hiermit einen Beitrag zur Frage der verschiedenartigen Reaktion dieser Teile auf die gleiche mutagene Einwirkung zu liefern.

B. Material und Methode.

Versuchsobjekt war die Handelsorte „Sieger“ von *Solanum lycopersicum*. Verwendet wurden junge Blütenknospen, deren Antheren vor dem Fixieren in Alkohol-Eisessig 2:1 völlig freigelegt und angeschnitten wurden. Die Antheren wurden als Quetschpräparate verarbeitet. Die Färbung erfolgte mit Eisenkarmin nach GEITLER (1942); man erzielt damit nach 24 Std einen guten färbereichen Kontrast zwischen den sehr feinen und nur schwach färbbaren euchromatischen Chromosomenenden und der Karyolymphe und schafft damit die Voraussetzungen für exakte Untersuchungen der frühen meiotischen Stadien, vor allem des Pachytäns. Die Antheren können durch Umlegen in Eisessigsäurekarmin ohne Eisenzusatz etwa 1 Tag lang im optimalen Färbungsgrad erhalten werden. Danach entfärben sich die Chromosomen wieder, gleichzeitig dunkeln die Karyolymphe und das Zytoplasma nach, wodurch der Kontrast zwischen Karyolymphe und Euchromatin verschwindet.

Für die Röntgenversuche wurden je Versuch 20 Infloreszenzen in 40 cm Länge abgeschnitten und bestrahlt. Die Dosis variierte zwischen 300 und 1000 r in Intervallen von 100 r. Nach der Bestrahlung wurden die Infloreszenzen in fließendes Wasser gestellt. Um die durch das Abschneiden der Infloreszenzen etwa auftretenden Schockwirkungen zu vermeiden, wurden außerdem noch 40 Pflanzen in Töpfen kultiviert und bestrahlt. Irgendwelche Unterschiede der Topfpflanzen gegenüber den abgeschnittenen Infloreszenzen konnten nicht festgestellt werden; die Versuche werden daher im folgenden zusammengefaßt. Die Bestrahlungen wurden mit dem Diax-Röntgenapparat der Firma Koch & Sterzel, Dresden, durchgeführt. (Röhre: Radiologie-Röhre Protecta, 6 kW. Röhrenfilter 0,4 Al. Spannung 56 kV, 4 mA Röhrenstrom = 34 r/min Leistung. Abstand vom Fokus 25 cm.) Optik: Binokulares Stativ Zeiß, Ölimmersion 100mal (Leitz), Okulare 10mal und 15mal. Großes mikrophotographisches Stativ von Zeiß.

C. Experimenteller Teil.

I. Die Analyse des Pachytäns von *Solanum lycopersicum*.

Die Unterscheidbarkeit der Chromosomen eines Genoms ist eine wichtige Voraussetzung für eine Reihe zytologischer und genetischer

Untersuchungen. Es war deshalb unser Bestreben, *alle* Pachytänchromosomen des Genoms von *Solanum lycopersicum* zu identifizieren, nachdem von OHLENDORF (1944) und BROWN (1949) durch die Beschreibung einiger Chromosomen bereits ein Ansatz hierzu gegeben war.

Von geeigneten Kernen und Einzelchromosomen wurden zunächst Zeichnungen angefertigt, wobei besonders die Zahl der Makrochromomeren, die bei *Solanum lycopersicum* ein wichtiges Strukturmerkmal der Chromosomen darstellen, berücksichtigt wurde. Darauf wurden diese Kerne photographiert, die Photos in stets der gleichen Vergrößerung auf Zeichenpapier projiziert und nachgezeichnet. Diese Zeichnungen wurden mehrmals ausgemessen und der Mittelwert aus 5 Messungen als Tabellenwert für das betreffende Chromosom verwendet. Die Untersuchungen an *Solanum lycopersicum* haben ergeben, daß die strukturbedingten Verschiedenheiten der einzelnen Chromosomen ausreichen, um das Genom trotz der für diesen Zweck hohen Chromosomenzahl ($n = 12$) zu analysieren.

a) Hilfsmittel für die Identifizierung der Pachytänchromosomen.

Als Hilfsmittel für die Identifizierung der einzelnen Chromosomen kommen folgende Struktureigentümlichkeiten in Betracht:

- die Chromosomenlänge,
- die Symmetrieverhältnisse der Chromosomen,
- die Lage der Insertionsstelle,
- die Zahl der Makrochromomeren im Heterochromatin,
- die Beschaffenheit der Endchromomeren.

Die *relative Länge* allein reicht für die Identifizierung eines Chromosoms nicht aus. Die meisten Chromosomen des Genoms unterscheiden sich hierin nicht wesentlich voneinander, es sind jedoch einzelne vorhanden, die im Hinblick auf ihre Größe sowohl nach oben als auch nach unten hin Extreme darstellen. Die Länge eines Chromosoms ist daher ein brauchbares Hilfsmittel für seine Einordnung in eine bestimmte Größenklasse, während sich die *Symmetrieverhältnisse* und die *Anzahl der „Makrochromomeren“* (MARQUARDT unveröffentlicht), das sind größere, stark färbbare Strukturelemente des Heterochromatins, als die wichtigsten Hilfsmittel für die Identifizierung der Einzelchromosomen erwiesen haben.

Alle Chromosomen des Genoms von *Solanum lycopersicum* sind partiell heterochromatisch und weisen mit Ausnahme des Satellitenchromosoms den für diesen Chromosomentypus charakteristischen Bauplan auf: Beiderseits der Insertionsstelle liegen 2 heterochromatische Segmente, an die sich die euchromatischen Enden anschließen. Jeder Chromosomenschenkel läuft in einem Endchromomer aus. Nach der Lage des Heterochromatins im Chromosom, zunächst ohne Berücksichtigung der Lage der Insertionsstelle, sind zu unterscheiden:

1. symmetrisch oder nahezu symmetrisch gebaute Chromosomen,
2. schwach asymmetrisch gebaute Chromosomen, an denen das längere euchromatische Ende höchstens doppelt so lang ist wie das kürzere,

3. stark asymmetrisch gebaute Chromosomen, deren langes Ende mindestens doppelt so lang ist wie das kurze.

In einer Anzahl von Chromosomen wird das Heterochromatin durch die Insertionsstelle in 2 isoliert sichtbare Partien zerlegt. Man kann daher als weiteres Unterscheidungsmerkmal die durch die verschiedene Lage der Insertionsstelle bedingten Symmetrieverhältnisse des Heterochromatins heranziehen. So kann die Insertionsstelle innerhalb des Heterochromatins, nicht in bezug auf das gesamte Chromosom, median oder submedian liegen und im letzteren Fall in Richtung auf den kürzeren oder längeren Chromosomenschenkel hin verschoben sein. Im Rahmen dieser Untersuchungen hat sich für die Lagebestimmung der Insertion die Bezugnahme der Symmetrieverhältnisse auf das Heterochromatin als vorteilhafter erwiesen als die auf das ganze Chromosom.

Die Lage der Insertionsstelle ist für eine Reihe von Chromosomen ein sehr wesentliches Strukturmerkmal, bei einigen anderen hingegen ist sie nur schwer sichtbar. In allen Chromosomen des Genoms kann es außerdem vorkommen, daß die heterochromatischen Partien beiderseits der Insertionsstelle nicht als einheitlicher Block, als dichte, lückenlose Packung von Makrochromomeren vorliegen, sondern daß zwischen sie kurze euchromatische Teile eingeschoben sind, die sich morphologisch von der Insertionsstelle nicht immer klar unterscheiden lassen. Die Makrochromomeren sind im Zygotän noch deutlich durch diese mehr oder weniger langen euchromatischen Regionen voneinander getrennt und sind in der Zahl wohl für jedes Chromosom konstant. Durch die Aufspiralisierung dieser Zwischenstücke nähern sie sich im Pachytän und berühren sich schließlich. In diesem Zustand, der zeitlich etwa mit dem frühen Pachytän zusammenfällt, läßt sich die wirklich vorhandene Zahl der Makrochromomeren noch feststellen. Mit zunehmender Kontraktion der kurzen euchromatischen Segmente verschwinden dann die Grenzen zwischen den ursprünglich isolierten heterochromatischen Partien. Dazu kommt noch, daß nunmehr auch die Kontraktion des Heterochromatins beginnt. Aus diesen Vorgängen resultiert morphologisch eine Reduktion der Zahl der Makrochromomeren im Verlaufe des Pachytäns.

Die Makrochromomeren sind echte Strukturmerkmale partiell heterochromatischer Chromosomen, ihre Zahl ist ein wichtiges, wenn auch kein absolutes Erkennungsmerkmal der Chromosomen. Die in großer Anzahl vorhandenen Chromomeren im Euchromatin sind keine zuverlässigen Strukturelemente. Sie sind oft so klein, daß ihre Zahl auch in gut gefärbten Chromosomen nicht mit Sicherheit festgestellt werden kann. Bedeutung kommt ihnen im Rahmen der Pachytänanalyse nur bei Chromosomen mit sehr kurzen, relativ kompakten euchromatischen Enden zu, in denen sich die Chromomerenzahl im

Euchromatin exakt ermitteln läßt. Die Chromosomenenden schließen in der Regel mit mehr oder weniger deutlich ausgeprägten heterochromatischen *Endchromomeren* ab, die für die Identifizierung einiger Chromosomen herangezogen werden können.

Wie wir später noch eingehender sehen werden, sind diese eben beschriebenen Faktoren für sich allein keine absolut sicheren, in jedem Falle gültigen Erkennungsmerkmale der Chromosomen. In ihrer Gesamtheit stellen sie jedoch eine durchaus brauchbare und ausreichende Handhabe dar, mit deren Hilfe sich die Analyse des Pachytäns von *Solanum lycopersicum* durchführen läßt.

b) Die Beschreibung der Einzelchromosomen des Genoms.

An Hand der oben genannten Prinzipien läßt sich eine Einteilung der Pachytänchromosomen vornehmen. Sie wurden zunächst nach ihren Symmetrieverhältnissen in 3 Gruppen eingeteilt (Tabelle 1). Diese 3 Gruppen lassen sich nach der

Tabelle 1. Die Einteilung des Genoms von *Solanum lycopersicum* nach den Symmetrieverhältnissen seiner Chromosomen.

Symmetrieverhältnis des Chromosoms	Lage der Insertionsstelle im Heterochromatin		
	median	submedian	nicht sichtbar
Symmetrisch oder nahezu symmetrisch	Chromosom Nr. 2 Chromosom Nr. 4	Chromosom Nr. 5 Chromosom Nr. 7	Chromosom Nr. 3 Chromosom Nr. 6
Schwach asymmetrisch			
Stark asymmetrisch	Chromosom Nr. 1 Chromosom Nr. 9	Chromosom Nr. 10 Chromosom Nr. 11 Chromosom Nr. 12	Chromosom Nr. 8

Lage der Insertionsstelle im Heterochromatin wiederum unterteilen. Die endgültige Identifizierung erfolgt nach spezifischen Merkmalen, die sich aus der Beschreibung der Einzelchromosomen ergeben. Die Chromosomenlänge spielt für die Identifizierung nur eine untergeordnete Rolle, da sie, wie wir später zeigen werden, stark variiert. Die Einteilung des Genoms nach der Chromosomenlänge ergibt sich aus der Tabelle 2. Eine schematische Zusammenstellung findet sich in Abb. 12.

Chromosom Nr. 1. Das Chromosom Nr. 1, das Satellitenchromosom, gehört zu den längsten Chromosomen der Mittelgruppe. Es sitzt mit einem tief gefärbten, heterochromatischen, oft auffallend großen Makrochromomer, dem Satelliten, am Nukleolus an. Das heterochromatische Segment enthält im Durchschnitt 13—15 Makrochromomeren, ihre Anzahl kann aber gerade beim SAT-Chromosom stark variieren. Die Insertionsstelle liegt genau median im heterochromatischen Mittelsegment. An das Heterochromatin schließt sich ein langes euchromatisches Ende mit einer großen Anzahl (etwa 20) sehr schwach färbbarer Chromomeren an. Das Endchromomer ist mittelgroß und deutlich ausgeprägt. Durchschnittliche Länge des Chromosoms 40 μ (vgl. Abb. 1 und 8).

Chromosom Nr. 2. Die Chromosomen Nr. 2 und 3 sind die beiden kleinsten Chromosomen des Genoms. Sie sind einander sehr ähnlich und lassen sich nicht in jedem Fall klar unterscheiden. Das Chromosom Nr. 2 ist in der Regel nahezu symmetrisch gebaut, nur in wenigen Fällen ist eine deutliche Asymmetrie fest-

stellbar. Charakteristisch für das Chromosom ist die niedrige Anzahl der Makrochromomeren (10—11). Die Insertionsstelle ist meist sichtbar, sie liegt nahezu median und teilt das Heterochromatin in 2 Partien zu je 5—6 Makrochromomeren

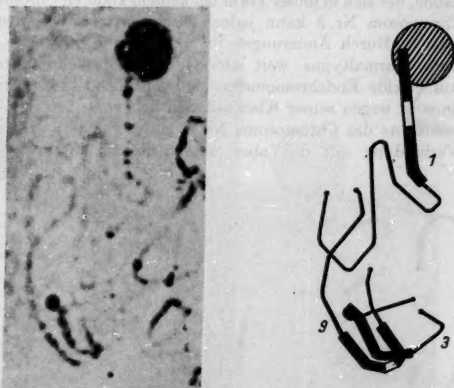


Abb. 1. Chromosomen Nr. 1, 3 und 9 im Pachytän von *Solanum lycopersicum*.

auf. Beide Endchromomeren sind groß und deutlich ausgebildet. Durchschnittliche Länge des Chromosoms 20μ (Abb. 2 und 4).

Chromosom Nr. 3. Das Chromosom Nr. 3 ist im typischen Fall schwach asymmetrisch gebaut. Seine Insertionsstelle ist nur selten sichtbar. Die Zahl der

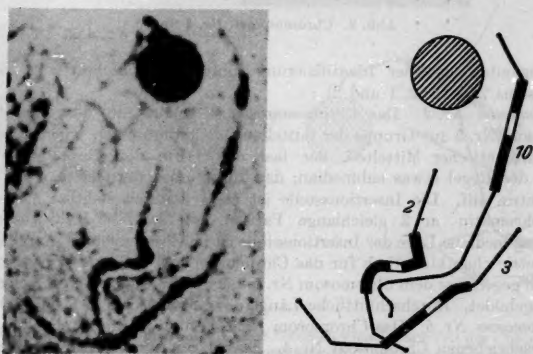


Abb. 2. Chromosomen Nr. 2, 3 und 10.

Makrochromomeren liegt mit 14—15 deutlich höher als beim Chromosom Nr. 2. Diese Unterschiede genügen in den meisten Fällen, um die beiden sehr ähnlichen Chromosomen auseinander zu halten. Der Gesamteindruck des Chromosoms ist stark vom Kontraktionsgrad des Hetero- und Euchromatins abhängig. Im Normalfall nimmt der heterochromatische Mittelteil einen sehr großen Raum innerhalb

des Chromosoms ein, an ihm hängen kurze, sehr kompakte euchromatische Enden. Eine klare Grenze zwischen Hetero- und Euchromatin läßt sich oft nicht feststellen. Es kommt auf diese Weise ein sehr charakteristischer, gedrungener Chromosomenbau zustande, der sich in dieser Form bei keinem anderen Chromosom wiederfindet. Das Chromosom Nr. 3 kann jedoch auch mit relativ langen Enden in Erscheinung treten. Durch Änderungen im Grad der Asymmetrie treten noch andere, oft vom Normaltypus weit abweichende Erscheinungsformen dieses Chromosoms auf. Beide Endchromomeren sind auffallend groß ausgebildet. Da sich das Chromosom wegen seiner Kleinheit deutlich von allen anderen Chromosomen (mit Ausnahme des Chromosoms Nr. 2) unterscheidet, wird eine Längenmessung in Verbindung mit den oben angeführten Strukturmerkmalen ohne

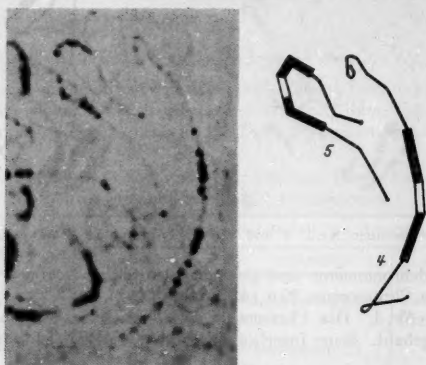


Abb. 3. Chromosomen Nr. 4 und 5.

Schwierigkeiten zu einer Identifizierung führen. Durchschnittliche Länge des Chromosoms 22μ (Abb. 1 und 2).

Chromosom Nr. 4. Das Chromosom Nr. 4 gehört mit dem ihm ähnlichen Chromosom Nr. 5 zur Gruppe der mittellangen Chromosomen. Sein relativ langer heterochromatischer Mittelteil, der fast die Hälfte des Chromosoms umfaßt, liegt in der Regel etwas submedian, das Chromosom weist somit eine schwache Asymmetrie auf. Die Insertionsstelle ist stets deutlich sichtbar und teilt das Heterochromatin in 2 gleichlange Partien von je 7–9 Makrochromomeren. Die streng mediane Lage der Insertionsstelle ist im Zusammenhang mit der leichten Asymmetrie charakteristisch für das Chromosom und stellt das Unterscheidungsmerkmal gegenüber dem Chromosom Nr. 5 dar. Beide Endchromomeren sind deutlich ausgebildet. Durchschnittliche Länge des Chromosoms 29μ (Abb. 3 und 10).

Chromosom Nr. 5. Das Chromosom Nr. 5 besitzt größte Ähnlichkeit mit dem eben beschriebenen Chromosom Nr. 4. Es hat mit ihm den in der Regel leicht asymmetrischen Bau, die Zahl der Makrochromomeren, die gute Ausbildung der Endchromomeren und schließlich die langgezogene, stets gut sichtbare Insertionsstelle gemeinsam. Letztere liegt aber hier im Gegensatz zum Chromosom Nr. 4 etwas submedian. Die dadurch entstehenden 2 ungleich großen heterochromatischen Partien unterscheiden sich jedoch nur unwesentlich in der Chromomerenzahl. Sie liegt im Durchschnitt bei 8–9 und 6–7. Durchschnittslänge 28μ (Abb. 3, 5 und 10).

Chromosom Nr. 6. Das Chromosom Nr. 6 zählt zu den längsten Chromosomen der mittellangen Gruppe. Es ist etwa symmetrisch gebaut. Sein Charakteristikum liegt in der für seine Länge ungewöhnlich niedrigen Zahl von 10–12 Makro-



Abb. 4. Chromosomen Nr. 2 und 6.

chromomeren. Die Lage der Insertionsstelle läßt sich nicht mit Sicherheit bestimmen. Durchschnittliche Länge des Chromosoms 38μ (Abb. 4 und 11).



Abb. 5. Chromosomen Nr. 5 und 7. Im linken heterochromatischen Teil des Chromosoms Nr. 5 ist die Hypochromasie sichtbar (Röntgenstrahlen 300 r, fixiert nach 6 Std.).

Chromosom Nr. 7. Das Chromosom Nr. 7 nimmt in seiner Struktur eine Mittelstellung zwischen den Chromosomen Nr. 10 und Nr. 5 ein. Es ist im typischen Fall etwas asymmetrisch gebaut. Der heterochromatische Mittelteil ist im Vergleich zum Gesamtchromosom sehr lang und wird durch die stets gut sichtbare, lang ausgezogene Insertionsstelle in 2 ungleich große Partien zerlegt; ein kleinerer Teil mit etwa 5 Makrochromomeren grenzt an das kurze euchromatische Ende

des Chromosoms, während der längere Teil mit 10–11 Makrochromomeren zum langen Ende überleitet. Als Charakteristikum des Chromosoms ist die Aufteilung des Heterochromatins durch die Insertionsstelle im Verhältnis 1:2 zu betrachten. Die Zahl der Makrochromomeren ist dabei im kurzen Teil niemals kleiner als 5. Damit ist der Unterschied zum Chromosom Nr. 10 gegeben, das im kurzen heterochromatischen Teil 3–4 Makrochromomeren enthält und außerdem extrem asymmetrisch ist. Als Unterscheidungsmerkmal gegenüber dem Chromosom Nr. 5



Abb. 6. Chromosom Nr. 8.

kann die Aufgliederung des Heterochromatins durch die Insertionsstelle verwendet werden. Durchschnittslänge 29μ (Abb. 5 und 10).

Chromosom Nr. 8: Das Chromosom Nr. 8 ist mit seinem stark asymmetrischen Bau und der Anzahl seiner Makrochromomeren morphologisch dem Chromosom



Abb. 7. Chromosom Nr. 9.

Nr. 9 sehr ähnlich. Der aus 12–15 Makrochromomeren zusammengesetzte heterochromatische Mittelteil läßt im Gegensatz zum Chromosom Nr. 9 die Insertionsstelle nicht erkennen. Als Vermittler zwischen dem Heterochromatin und dem langen euchromatischen Schenkel findet sich oft eine längere Übergangszone aus 4–6 mittelgroßen Chromomeren. Durchschnittliche Länge des Chromosoms 30μ (Abb. 6, 10 und 11).

Chromosom Nr. 9. Das Chromosom Nr. 9 zählt mit seinem stark asymmetrischen Bau und der stets gut sichtbaren Insertionsstelle zu den charakteristischsten Chromosomen des Genoms. Die Insertionsstelle liegt ziemlich genau median und ist meist lang ausgezogen. Sie teilt das Heterochromatin in 2 gleiche Hälften von je 6–8 Makrochromomeren. Das kurze euchromatische Ende ist in der Regel kompakt und mit 3–4 Chromomeren versehen. Zwischen dem Heterochromatin und dem langen euchromatischen Ende kann eine Übergangszone aus 3–4 mittelgroßen Chromomeren eingeschaltet sein. Vom Chromosom Nr. 8 unterscheidet sich Nr. 9 durch die deutliche Ausprägung seiner Insertionsstelle. Durchschnittliche Länge des Chromosoms 31μ (Abb. 7, 9 und 10).

Chromosom Nr. 10. Das Chromosom Nr. 10 besitzt einen extrem asymmetrischen Bau. Auf ein kurzes, sehr kompaktes euchromatisches Ende mit 2—3 Chromomeren folgt eine kurze heterochromatische Partie, die sich meist aus 4, seltener aus 3 Makrochromomeren zusammensetzt. Die stets deutlich sichtbare, lang ausgezogene Insertionsstelle leitet zu einem längeren heterochromatischen

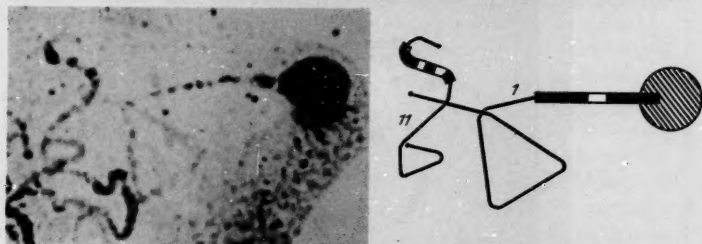


Abb. 8. Chromosomen Nr. 1 und 11.

Teil aus 7—9 Makrochromomeren über, sie liegt also submedian. Zwischen dem Heterochromatin und dem langen euchromatischen Ende ist eine Übergangszone eingeschaltet. Vielfach finden sich in einiger Entfernung vom Heterochromatin

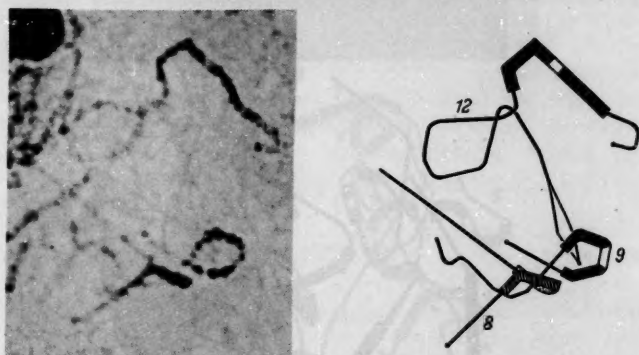


Abb. 9. Chromosomen Nr. 9 und 12. Das lange, nur sehr schwach färbbare euchromatische Ende des Chromosoms Nr. 12 ist kaum sichtbar.

2 große, gut färbbare und dicht aufeinanderfolgende Chromomeren im Euchromatin. Der kurze Schenkel besitzt ein großes Endchromomer. Gewisse Ähnlichkeiten bestehen mit den Chromosomen Nr. 7, 9 und 11. Gegenüber dem Chromosom Nr. 7 ermöglicht die ausgesprochen extreme Asymmetrie, gegenüber dem Chromosom Nr. 9 die submedian Lage der Insertionsstelle seine richtige Einordnung. Durchschnittliche Länge des Chromosoms 32μ (Abb. 2 und 10).

Chromosom Nr. 11. Das Chromosom Nr. 11 ist dem Chromosom Nr. 10 sehr ähnlich. Es ist ebenfalls stark asymmetrisch gebaut, im Heterochromatin befindet sich jedoch eine lange euchromatische Brücke, die sich morphologisch nicht von der Insertionsstelle unterscheiden läßt. Dadurch erscheint das Heterochromatin

dreigeteilt und zwar aus $4 + 2 + 2$ Makrochromomeren bestehend. Diese Struktur des Heterochromatins findet sich in keinem anderen Chromosom und macht das

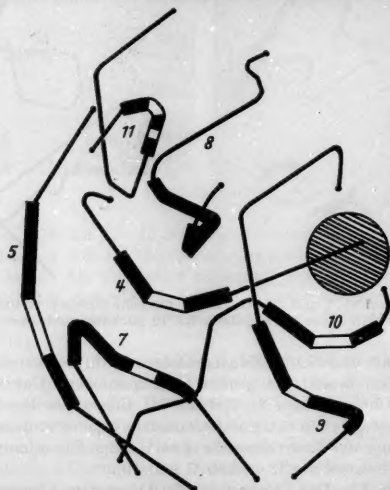
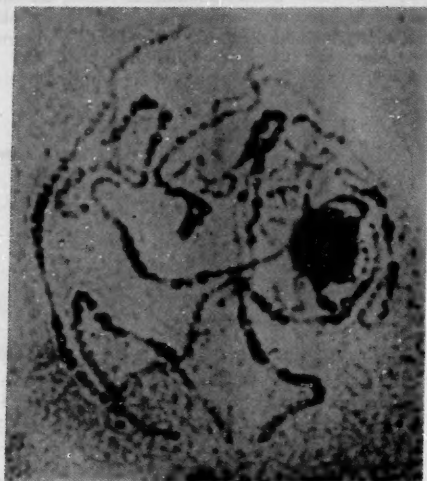


Abb. 10. Pachytän-Kern mit den Chromosomen Nr. 4, 5, 7, 8, 9, 10 und 11.

Chromosom Nr. 11 — neben dem Satellitenchromosom — zum charakteristischsten Chromosom des Genoms. Aus dem Verhalten des Chromosoms gegenüber der

Einwirkung mutagener Agenzien läßt sich mit Sicherheit schließen, daß die erste, dem kurzen euchromatischen Schenkel zugekehrte achromatische Zone die Insertionsstelle ist. Durchschnittliche Länge des Chromosoms 26μ (Abb. 8 und 10).

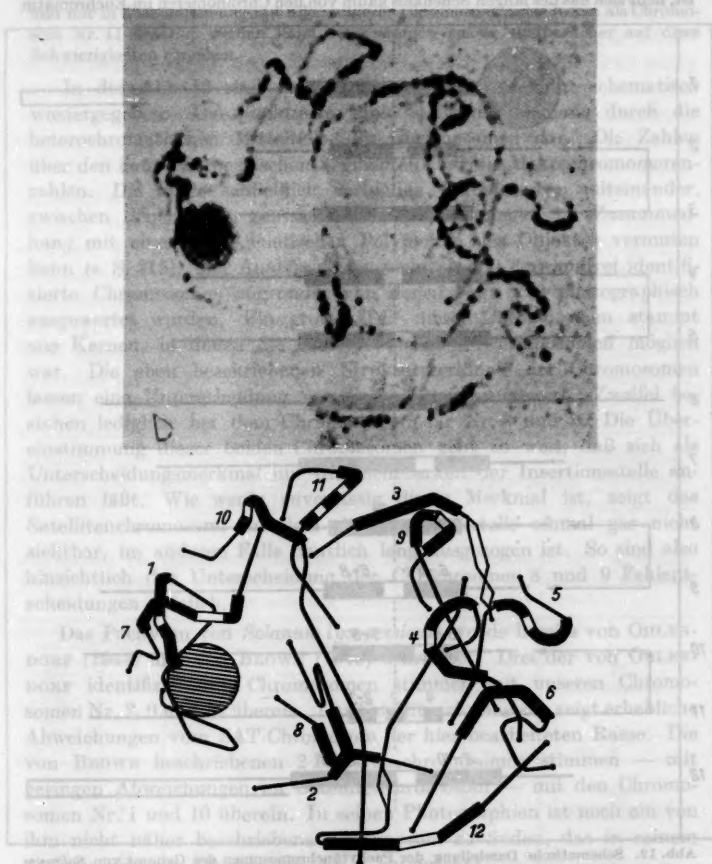


Abb. 11. Übersichtlicher Pachytänkern von *Solanum lycopersicum*, in dem alle Chromosomen des Genoms identifiziert werden konnten.

Chromosom Nr. 12. Das Chromosom Nr. 12 ist das längste Chromosom des Genoms. Es ist extrem asymmetrisch gebaut. An das kompakte kurze Ende schließt sich eine lange heterochromatische Partie an, deren Chromomerenzahl je nach dem Kontraktionsgrad des Heterochromatins erheblich schwankt, durchschnittlich sind es etwa 20. Die Insertionsstelle liegt leicht submedian, ist aber nicht immer sichtbar. Das sehr lange euchromatische Ende ist in seinem ganzen

Verlauf nur in den Kernen zu verfolgen, in denen eine sehr kontrastreiche Färbung gelungen ist, in denen also Karyolymphe und Zytoplasma nicht angefärbt sind. Während das Endchromomer des kurzen Schenkels groß und deutlich ausgeprägt ist, hebt sich das des langen Schenkels kaum von den Chromomeren im Euchromatin

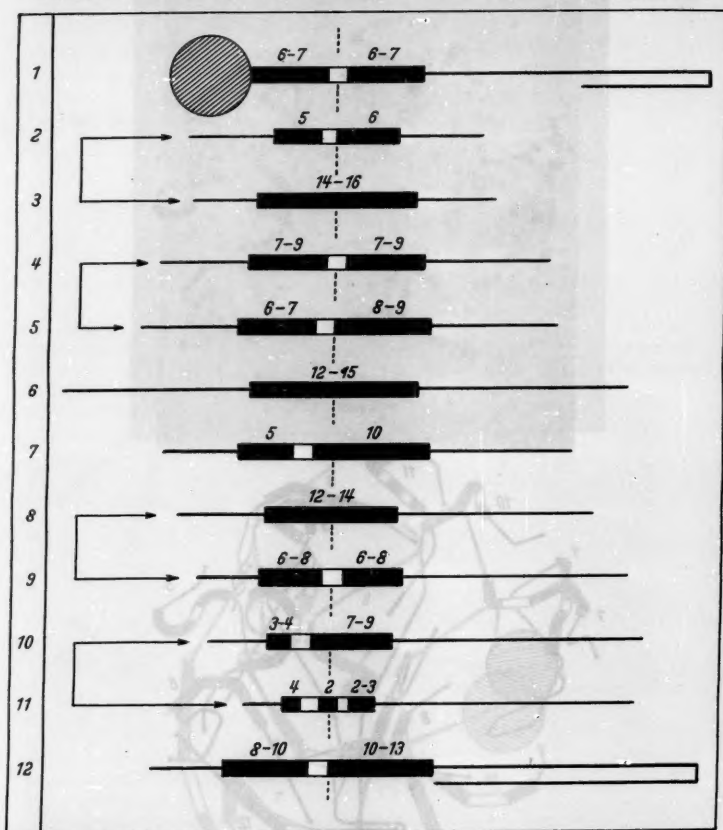


Abb. 12. Schematische Darstellung der Pachytänchromosomen des Genoms von *Solanum lycopersicum*. Die Chromosomen sind nach den Symmetrieverhältnissen geordnet (Erläuterung im Text).

ab. Wegen seiner Länge ist das Chromosom nur sehr selten in übersichtlicher Lage anzutreffen. In den Kernen, in denen es sich über seine gesamte Länge hinweg verfolgen läßt, bereitet seine Identifizierung keine Schwierigkeiten. Durchschnittliche Länge 58μ (Abb. 9 und 11).

Abb. 10 zeigt einen Kern, in dem die Chromosomen Nr. 4, 5 und 7—11 so isoliert liegen, daß ihre Identifizierung möglich ist. Ein weitgehend aufgelockerter Kern

mit allen 12 Chromosomen ist schließlich in Abb. 11 wiedergegeben. Die Mehrzahl der Chromosomen läßt sich an Hand der Schemazeichnung von Anfang bis Ende verfolgen. Schlecht sichtbar sind die Chromosomen 1 und 2, während das Chromosom 11 in diesem Kern eine Grenzform seines sonst üblichen Bauplans darstellt und nur in Zusammenhang mit allen anderen Chromosomen des Kerns als Chromosom Nr. 11 erkannt werden kann. Wir werden später ausführlicher auf diese Schwierigkeiten eingehen.

In der Abb. 12 sind die Chromosomen des Genoms schematisch wiedergegeben. Die punktierte Linie stellt die Mediane durch die heterochromatischen Mittelteile der Chromosomen dar. Die Zahlen über den heterochromatischen Segmenten sind die Makrochromomerenzahlen. Die Pfeile schließlich verbinden Chromosomen miteinander, zwischen denen man gewisse Homologiebeziehungen im Zusammenhang mit einer phylogenetischen Polyploidie des Objektes vermuten kann (s. S. 315). Der Analyse liegen mehr als 400 einwandfrei identifizierte Chromosomen zugrunde, von denen etwa 220 photographisch ausgewertet wurden. Ein großer Teil dieser Chromosomen stammt aus Kernen, in denen die Analyse mehrerer Chromosomen möglich war. Die eben beschriebenen Strukturmerkmale der Chromosomen lassen eine Unterscheidung sämtlicher Chromosomen zu. Zweifel bestehen lediglich bei dem Chromosomenpaar Nr. 8 und 9. Die Übereinstimmung dieser beiden Chromosomen geht so weit, daß sich als Unterscheidungsmerkmal nur die Sichtbarkeit der Insertionsstelle anführen läßt. Wie wenig zuverlässig dieses Merkmal ist, zeigt das Satellitenchromosom, an dem die Insertionsstelle einmal gar nicht sichtbar, im anderen Falle deutlich lang ausgezogen ist. So sind also hinsichtlich der Unterscheidung der Chromosomen 8 und 9 Fehleinscheidungen möglich.

Das Pachytän von *Solanum lycopersicum* wurde bereits von OHLENDORF (1944) und von BROWN (1949) bearbeitet. Drei der von OHLENDORF identifizierten 4 Chromosomen stimmen mit unseren Chromosomen Nr. 2, 9 und 10 überein. Das Satellitenchromosom zeigt erhebliche Abweichungen vom SAT-Chromosom der hier bearbeiteten Rasse. Die von BROWN beschriebenen 2 Pachytänchromosomen stimmen — mit geringen Abweichungen im Satellitenchromosom — mit den Chromosomen Nr. 1 und 10 überein. In seinen Photographien ist noch ein von ihm nicht näher beschriebenes Chromosom zu finden, das in seinem Aufbau unserem Chromosom Nr. 9 entspricht¹.

¹ Während des Druckes dieser Arbeit wurde mir eine Arbeit von D. W. BARTON [Pachytene morphology of the Tomato chromosome complement. Amer. J. of Bot. 37, 639—642 (1950)] bekannt, der ebenfalls das Pachytän von *Solanum lycopersicum* analysiert hat. Die von ihm bearbeitete Rasse stimmt in 10 Chromosomen mit der in der vorliegenden Arbeit analysierten Handelsorte „Sieger“ überein.

c) Die Variabilität der Baupläne der Pachytänchromosomen.

Die Beschreibung der Einzelchromosomen des Genoms, wie sie oben gegeben wurde, bedarf noch einer Erweiterung. Es ist die Frage zu beantworten, inwieweit die in der Abb. 12 angegebenen Baupläne der Chromosomen variieren und ob die Abweichung von der Norm so weit gehen kann, daß der Charakter eines Chromosoms entscheidend davon beeinflußt wird. In diesem Zusammenhang ist zunächst die Frage der Chromosomenlänge zu behandeln, im Anschluß daran die Allgemeingültigkeit der Symmetrieverhältnisse und der Zahl der Makrochromomeren zu untersuchen.

Die Länge gleicher Pachytänchromosomen kann in verschiedenen Kernen stark variieren. In der Tabelle 2 sind die mittleren Längen und die Variationsbreite der 12 Chromosomen des Genoms von *Solanum lycopersicum* zusammengestellt. Die letzte Spalte gibt dabei den Prozentsatz an, um den das jeweils kürzeste Chromosom der betreffenden Klasse kleiner ist als das längste. Die Größenunterschiede liegen bei der Mehrzahl der Chromosomen zwischen 30 und 40%, steigen beim Chromosom Nr. 12 sogar auf 45% an. Die Streubereiche der einzelnen Chromosomen überschneiden sich vielfach. Die Maximalwerte einer Reihe mittellanger Chromosomen erreichen nahezu den Minimalwert des Chromosoms Nr. 12 oder überschreiten ihn sogar, während die niedrigsten Werte der mittellangen Chromosomen zum Teil kleiner sind als die Maximalwerte der kleinsten Chromosomen des Genoms.

Tabelle 2. Die Streuung der Längen der Pachytänchromosomen des Genoms von *Solanum lycopersicum*. Die Chromosomen des Genoms sind in der Reihenfolge ihrer Durchschnittslängen aufgeführt (Chromosomenlängen in μ).

Größenklasse	Nr. des Chromosoms	Zahl der ausgemessenen Chromosomen	Länge der Chromosomen			Differenz zwischen Maximum und Minimum	
			Durchschnittslänge	Maximum	Minimum	in μ	in % (Maximallänge = 100 %)
Kurze Chromosomen	2	19	20	23	14	9	39,1
	3	19	22	25	19	6	24,0
Mittellange Chromosomen	11	10	26	33	21	12	36,4
	5	16	28	37	23	14	37,3
	4	24	29	36	25	11	30,6
	7	16	29	38	23	15	39,5
	8	16	30	35	25	10	28,6
	9	12	31	38	26	12	31,6
Lange Chromosomen	10	22	32	40	24	16	40,0
	6	11	38	45	29	16	35,6
	1	12	40	46	30	16	34,8
	12	11	58	74	41	33	44,6

Die Tabelle 3 enthält den Vergleich einer Reihe von Chromosomenpaaren aus verschiedenen Kernen. Die durchschnittliche Länge z. B. der beiden Chromosomen Nr. 4 und 8, die aus dem Gesamtmaterial der Pachytänanalyse errechnet wurde, ist etwa gleich, aber nur im Kern 304 unserer Tabelle entspricht die Länge der beiden Chromosomen dem Durchschnittswert. In den Kernen 299 und 311 ist das Chromosom Nr. 8, im Kern 353 das Chromosom Nr. 4 das längere. Dabei sind die Größenunterschiede recht erheblich. Das gleiche ist in der Tabelle 3 für andere Chromosomenpaare nachgewiesen und gilt ganz allgemein für alle Chromosomen des Genoms. Die Chromosomenlänge hängt ab vom Grad der Spiralisierung, die im Lauf des Pachytäns ständig zunimmt. Man sollte annehmen, daß die Größenverhältnisse der Chromosomen eines Genoms trotzdem erhalten bleiben. Aus unseren Längenmessungen geht aber hervor, daß beim Vergleich zweier bestimmter Chromosomen des Genoms aus verschiedenen Kernen das gegenseitige Größenverhältnis dieser beiden Chromosomen nicht festgelegt ist, sondern umschlagen kann. Daraus ist weiterhin zu schließen, daß die Spiralisierung der

Tabelle 3. Vergleich des gegenseitigen Längenverhältnisses je zweier bestimmter Pachytänchromosomen aus verschiedenen Kernen (Chromosomenlängen in μ).

Kern Nr.	Länge des Chromosoms im Kern	Errechnete Durchschnittslänge des Chromosoms	Länge des Chromosoms im Kern	Errechnete Durchschnittslänge des Chromosoms
Chromosom Nr. 4			Chromosom Nr. 8	
299	26	29 (aus 24 Kernen)	35	30 (aus 15 Kernen)
311	30		31	
304	31		32	
353	33		28	
Chromosom Nr. 4			Chromosom Nr. 5	
353	33	29 (aus 24 Kernen)	23	28 (aus 15 Kernen)
318	33		29	
350	29		26	
349	29		30	
311	30		37	
Chromosom Nr. 5			Chromosom Nr. 8	
311	37	28 (aus 15 Kernen)	31	30 (aus 15 Kernen)
317	33		31	
352	28		26	
353	23		28	
Chromosom Nr. 2			Chromosom Nr. 3	
298	21	20 (aus 19 Kernen)	20	22 (aus 19 Kernen)
314	22		21	
353	21		20	
354	23		23	
348	19		20	
302	21		22	
360	19		22	
349	14		23	

einzelnen Chromosomen verschieden schnell vor sich gehen kann. Aus diesen Befunden ergibt sich in Verbindung mit der oben beschriebenen großen Variationsbreite der Chromosomenlängen, daß der Länge eines Einzelelchromosoms nur eine geringe Bedeutung für seine Identifizierung zukommt.

Auch die *Symmetrieverhältnisse* der Chromosomen erweisen sich bei näherer Untersuchung als nicht unbedingt konstant. Vergleicht man mehrere Individuen eines bestimmten Chromosoms, etwa des im Normalfall nahezu symmetrisch gebauten Chromosoms Nr. 5, aus verschiedenen Kernen, so kann das Chromosom einen mehr oder weniger asymmetrischen Bau aufweisen. In Extremfällen fanden wir ein Endenverhältnis der beiden Schenkel von 1:2,5. Damit fällt aber das im Normalfall symmetrisch oder nur leicht asymmetrisch gebaute Chromosom in den Streubereich des sehr stark asymmetrischen Chromosoms Nr. 9. Die Umprägung des Chromosoms zu einem von der mittleren Ausbildungsform abweichenden Typus geht aber noch weiter: Die Insertionsstelle des Chromosoms Nr. 5 liegt im Normalfall etwas submedian, sie teilt also das Heterochromatin in 2 ungleich große Partien auf. Es kann nun die größere dieser beiden heterochromatischen Partien an das *kürzere*, in anderen Fällen hingegen an das *längere* euchromatische Ende angrenzen. Vergleicht man die allerdings nur selten auftretenden Grenzformen des Chromosoms Nr. 5, so möchte man annehmen, es handle sich um 2 völlig verschiedene Chromosomentypen des Genoms, zumal noch Unterschiede in der Zahl der Makrochromomeren auftreten können. Das gleiche läßt sich auch für andere Chromosomen nachweisen.

Schließlich sei noch die Zuverlässigkeit der *Zahl der Makrochromomeren* als Erkennungsmerkmal für ein Chromosom geprüft. In der Abb. 13 ist die Streuung der Chromomerenzahlen von 70 Satelliten-Chromosomen zusammengestellt, und zwar getrennt für die beiden beiderseits der Insertionsstelle liegenden heterochromatischen Abschnitte des Chromosoms. Der dritte Teil der Figur enthält die Streuung des heterochromatischen Mittelsegments in seiner Gesamtheit. Die 3 Kurven sind typische Binominalkurven, die zwar eine relativ breite Streuung der Zahl der Makrochromomeren zeigen, in denen aber die vom Mittelwert stärker abweichenden Klassen nur selten vertreten sind. Der Kurvenverlauf zeigt, daß die Anzahl der Makrochromomeren ein relativ konstantes Strukturelement der Chromosomen ist. Sie wird bei der Identifizierung eines Chromosoms oftmals die entscheidende Rolle spielen, vor allem dann, wenn die Insertionsstelle sichtbar ist und ein getrenntes Auszählen der beiden heterochromatischen Abschnitte gestattet. Im Rahmen der Pachytänanalyse kann allerdings die Möglichkeit, daß in Ausnahmefällen stark abweichende Chromomerenzahlen auftreten, nicht unberücksichtigt bleiben. Es kann dadurch der normale Bauplan eines

Chromosoms so abgeändert werden, daß seine Identifizierung stark erschwert wird.

Die kritische Betrachtung der Merkmale, die für eine Identifizierung in Frage kommen, zeigt also, daß es für ein Pachytänchromosom bei *Solanum lycopersicum* kein konstantes Strukturmerkmal gibt, das für sich allein die absolut exakte Identifizierung eines isolierten Einzelchromosoms ermöglicht. Die Tabellen 2 und 3 und die Abb. 13 haben darüber hinaus gezeigt, daß man den Pachytänchromosom keine starren Baupläne zuordnen kann. Die Struktur verschiedener Individuen des

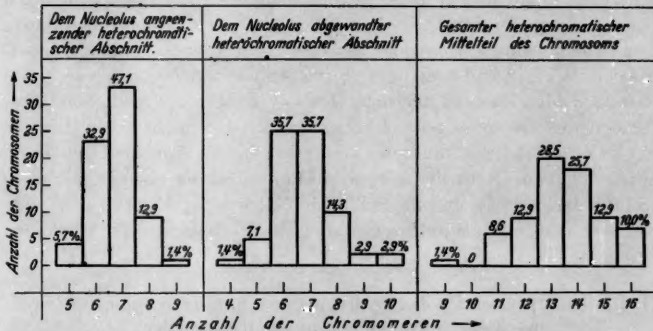


Abb. 13. Die Streuung der Zahl der Makrochromosomen im Heterochromatin von 70 Satellitenchromosomen von *Solanum lycopersicum*.

gleichen Chromosomentypus kann vielmehr so stark variieren, daß es auch bei genauester Kenntnis des Pachytäns von *Solanum lycopersicum* nicht immer möglich ist, jedes isolierte Einzelchromosom zu identifizieren. Wenn den Chromosomen in der Abb. 12 trotzdem bestimmte Strukturen zugeordnet werden, so besteht doch Klarheit darüber, daß diese Aufstellung lediglich einen Mittelwert des Genoms von *Solanum lycopersicum* darstellt. Die Einzelmerkmale stellen erst in ihrer Gesamtheit eine Handhabe dar, mit deren Hilfe die Identifizierung der meisten Chromosomen gelingt. Sie ist um so zuverlässiger, je mehr Chromosomen in einem Kern der Untersuchung zugänglich sind.

II. Das Genom von *Solanum lycopersicum* im Hinblick auf eine Polyploidie des Objektes.

Solanum lycopersicum besitzt diploid 24 Chromosomen. Die Chromosomenzahl von $n = 12$ hat sich schon bei anderen Solanaceen, besonders bei einer Reihe alter Kulturpflanzen (*Solanum tuberosum*, *Nicotiana*-Arten u. a.) als nicht die ursprüngliche haploide Chromosomenzahl erwiesen. Eingehende genetische Untersuchungen haben vielmehr

ergeben, daß diese Formen tetraploide Organismen mit der Grundzahl 6 sind. Die Kenntnis des Pachytäns gestattet von der zytologischen Seite her einen Hinweis auf dieses Problem. Eine gewisse Schwierigkeit bei der Analyse des Genoms von *Solanum lycopersicum* liegt darin, daß eine exakte Identifizierung einiger Chromosomen nur mit großer Mühe durchgeführt werden kann, weil diese anscheinend 2mal im Genom vorhanden sind. Tatsächlich sind die Unterschiede zwischen den Chromosomen der Paare Nr. 2 und 3, 4 und 5, 8 und 9, 10 und 11 relativ gering, und es erscheint bei einer rein zytologischen Betrachtungsweise auf Grund einer Reihe gemeinsamer Züge in den Bauplänen der oben genannten Chromosomenpaare durchaus als möglich, daß die Chromosomen dieser Paare früher einmal Homologe gewesen sein können. Eine Genommutation müßte irgendwann in der Phylogenie von *Solanum lycopersicum* den tetraploiden Zustand herbeigeführt haben. Für die restlichen Chromosomen des Genoms sind keine klaren Verwandtschaftsbeziehungen mehr zu ermitteln. Sie müßten sich stärker bis zu ihrer heutigen Form verändert haben. Natürlich kann die Ähnlichkeit der oben angeführten Chromosomen ebensogut rein zufälliger Natur sein. Exaktere Befunde ließen sich erst durch eine Untersuchung des Pachytäns einer Haploiden erbringen.

III. Die Untersuchungen des Pachytäns von *Solanum lycopersicum* nach der Einwirkung von Röntgenstrahlen.

Die Wirkung der Röntgenstrahlen als mutationsauslösendes Agens ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Bearbeitung. Soweit es sich dabei um Fragen der Chromosomenmutationen handelt, sind — mit Ausnahme der Arbeiten an *Drosophila* — vornehmlich mittlere und späte meiotische und mitotische Stadien untersucht worden, im wesentlichen Meta- und Anaphasen, allenfalls noch späte Prophasen. Der Vorteil dieser Stadien liegt in der Übersichtlichkeit der Kerne, die es gestattet, alle aufgetretenen Chromosomenmutationen quantitativ zu erfassen. In der vorliegenden Arbeit soll nun ein frühes meiotisches Stadium, das Pachytän, in seiner Reaktion auf die Einwirkung von Röntgenstrahlen untersucht werden.

Das Pachytän der Pollenmutterzellen ist für die Analyse von Chromosomenmutationen besonders gut geeignet, denn hier zeigt sich die Chromosomenstruktur so deutlich wie in keinem anderen meiotischen oder mitotischen Entwicklungsstadium. Dazu kommt noch, daß durch die Paarung der Homologen alle durch Umbauten oder Stückverluste aufgetretenen Unterschiede zwischen den Homologen in Form abweichender Paarungsfiguren deutlich in Erscheinung treten. Die durch die hohe Chromosomenzahl in diesem frühen meiotischen Stadium bedingte Unübersichtlichkeit der meisten Pachytänkerne läßt eine

quantitative Auswertung des Pachytäns von *Solanum lycopersicum* nicht zu. An Hand der Pachytänanalyse können aber exakte qualitative Feststellungen über die aufgetretenen Chromosomenmutationen gemacht werden, vor allem im Hinblick auf die Lage der Bruchstellen in den Chromosomen.

Die Untersuchungen von POLITZER (1924), PEKAREK (1927) und MARQUARDT (1938) haben einen klaren Unterschied der Röntgenwirkung auf Ruhekerne und auf Teilungskerne ergeben. Es seien zunächst die Untersuchungen von Pachytänkernen angeführt, die als Ruhekerne mit Dosen von 500—1000 r bestrahlt wurden.

a) Das Pachytän nach der Bestrahlung prämeiotischer Ruhekerne.

Die Meiosis von *Solanum lycopersicum* läuft nach OHLENDORF (1944) in 3—4 Tagen ab, wir müssen also bei der relativ langen Dauer der frühen meiotischen Prophase für die Entwicklung vom prämeiotischen Ruhekern bis zum Pachytän etwa 3 Tage veranschlagen. Die Antheren der vorliegenden Versuchsreihe wurden daher nach 2, 3 und 4 Tagen fixiert. Die Pollenmutterzellen, deren Kerne zum Zeitpunkt der Fixierung das Pachytän durchliefen, befanden sich somit zum Zeitpunkt der Bestrahlung mit Sicherheit im Stadium prämeiotischer Ruhekerne. Als Folge der Bestrahlung des Ruhekerne treten im Pachytän alle Konfigurationstypen auf, die auf Grund von Bruch und Rekombination der freien Bruchflächen und der nachfolgenden Paarung der homologen Chromosomensegmente zu erwarten sind (Tabelle 4, S. 325). Den weitaus größten Anteil an den aufgefundenen Chromosomenmutationen haben die reziproken Translokationen, die im Pachytän in Form der Kreuzkonjugationen auftreten. Die Zahl der Inversionen und Deletionen ist sehr gering. In einer Reihe von Deletionsfiguren konnte eine inhomologe Paarung der partnerlosen Chromosomenabschnitte festgestellt werden.

Besondere Beachtung verdient ein Aberrationstypus, dessen Deutung wichtige Aufschlüsse über die Entstehung von Chromosomentranslokationen geben kann. Es handelt sich dabei, wie Abb. 14 zeigt, um dreischenkellige Paarungsfiguren. Die Feinstruktur der gepaarten Chromosomenteile stimmt bei den Partnern auf das genaueste überein, so daß die Homologie dieser Teile außer Frage steht. Es liegt also hier nicht, wie bei den T-Konfigurationen von *Zea Mays* (McCLINTOCK 1933) eine Paarung nichthomologer Chromosomensegmente vor. Auch die „dreistrahligten Figuren“, die ERNST (1938) bei *Antirrhinum* fand und die durch die Reaktion einer freien Bruchfläche mit einem normalen Chromosomenende zustande gekommen sind, haben nur eine morphologische Ähnlichkeit mit den hier gefundenen Konfigurationen. Unseren Figuren liegt eine 3-Bruch-Restitution zugrunde, an der aber nicht Chromatiden, sondern Chromosomen beteiligt sind. Die Figur ist so zu deuten

(Abb. 14): Von den beiden Homologen eines Pachytänbivalents (1—2 und 1'—2') ist ein Chromosom ungeschädigt geblieben (1'—2'), das andere (1—2) ist durch die Wirkung der Röntgenstrahlen gebrochen. Die beiden Bruchflächen dieses Chromosoms sind mit den Bruchflächen zweier anderer Chromosomen verheilt, die aber, und das ist das Besondere dabei, 2 Homologe sind, die genau im gleichen Locus gebrochen sein müssen (3—4 und 3'—4'). In 28 von 41 Fällen war dieser Ort die Insertionsstelle. Durch die Rekombination der freien Bruchflächen kommen die beiden halbhomologen translozierten Chromosomen 1—4 und 2—4'

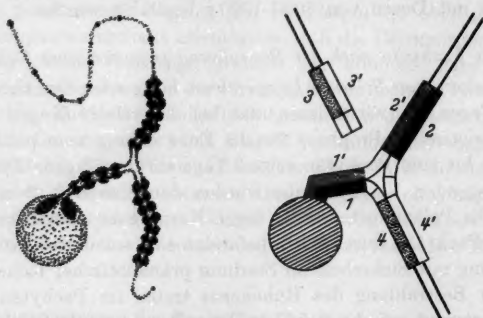


Abb. 14. 3-Bruch-Restitution, an deren Bildung das Satellitenbivalent beteiligt ist. Bruchstelle für das Satellitenchromosom (1—2) mit Sicherheit, für die anderen beiden Homologen (4,4') mit großer Wahrscheinlichkeit in der Insertionsstelle (Erläuterungen im Text). (500 r, fixiert nach 3 Tagen.)

zustande. Durch die Konjugation dieser beiden translozierten Chromosomen mit dem ungeschädigten Chromosom 1'—2' entsteht sodann die dreischenkligte Pachytänfigur, wie sie in 17 Fällen in unseren Röntgenversuchen aufgefunden wurde. Außer dieser 3-Bruch-Restitution müssen in einem derartig geschädigten Kern noch 2 gepaarte Chromosomenfragmente (3—3') vorhanden sein, die durch Restitution ihrer Bruchflächen ein Isochromosom bilden können. Sie konnten jedoch wegen der Unübersichtlichkeit des *Solanum*-Pachytäns nicht aufgefunden werden. Die 3-Bruch-Restitution müßte in der Diakinese eine Dreierfigur, das Isochromosom ein geschlossenes oder offenes Univalent ergeben.

Das merkwürdige Zusammentreffen, daß 2 Brüche, die an der gleichen Stelle zweier homologer Chromosomen auftreten, gleichzeitig mit den beiden Bruchflächen eines dritten Chromosoms rekombinieren, dürfte, wenn es zufälliger Art wäre, mit minimaler Häufigkeit auftreten. Tatsächlich finden sich aber solche Figuren relativ oft, sie liegen mit knapp 5% der Gesamtzahl der aufgefundenen Aberrationen etwa in der gleichen Größenordnung wie die Deletionen. Eine Deutung des

Zustandekommens derartiger Konfigurationen ist möglich unter Zugrundelegung von 2 zunächst hypothetischen Voraussetzungen: Es müssen bestimmte Chromosomenloci besonders bruchempfindlich sein, denn nur so ist es zu verstehen, daß 2 homologe Chromosomen im gleichen Locus brechen können. Ein solcher Ort ist bei *Solanum lycopersicum* die Insertionsstelle, wie später an Hand anderer Befunde gezeigt werden wird. Es kommen jedoch auch andere Chromosomenloci in Frage, denn mehrfach ist deutlich nicht die Insertionsstelle der Ort des Bruches beider Homologer. Die Art der Rekombination setzt außerdem eine gesetzmäßige räumliche Nähe dieser beiden Bruchflächen voraus, sonst könnten sie nicht beide mit den freien Bruchflächen, die durch einen weiteren Bruchvorgang an einem dritten Chromosom entstanden sind, verheilen. Eine derartige Annäherung ergibt sich aber in der Meiosis regelmäßig durch die Chromosomenpaarung. Die zweite Voraussetzung ist also die, daß die Paarung der homologen Chromosomen zum Zeitpunkt der Rekombination schon vollzogen ist. Es ist in diesem Zusammenhang nun besonders interessant, daß die 3-Bruch-Restitutionen sowohl nach Bestrahlung des Pachytäns als auch nach Bestrahlung des prämeiotischen Ruhekerns gefunden wurden. Bei der Bestrahlung des Ruhekerns bedeutet das aber, daß zwischen Applikation und Effekt eine bestimmte Zwischenzeit, im vorliegenden Falle etwa 2 Tage, eingeschoben ist. Diese Schwierigkeit wäre beseitigt, wenn die Konjugation der heterochromatischen Segmente bereits im prämeiotischen Ruhekern vor sich gehen würde. Die Zahl der Chromozentren im Ruhekern liegt aber deutlich höher als 12 und entspricht in der Überzahl aller Kerne der diploiden Chromosomenzahl. Außerdem läßt sich in übersichtlichen Zygotänkernen einwandfrei beobachten, daß sich die heterochromatischen Segmente der Homologen noch nicht gepaart haben. Nach BROWN (1949) erfolgt die Paarung des Heterochromatins bei *Solanum lycopersicum* sogar erst im späten Zygotän nach der Konjugation der euchromatischen Enden. Die beobachteten Vorgänge werden aber verständlich durch die Annahme, daß die Röntgenstrahlen als primäre Wirkung zunächst kern- oder zellphysiologische Schädigungen zustande bringen, denen dann erst sekundär, im vorliegenden Falle im Pachytän, die Chromosomenbrüche folgen.

Außer den Kreuzkonjugationen, Deletionen, Inversionen und 3-Bruch-Restitutionen fanden sich in den Röntgenversuchen noch einige kompliziertere Figuren, an denen mehrere Bivalente beteiligt sein können und deren Zustandekommen auf mehrere Restitutionsvorgänge in der gleichen Konjugationsgruppe zurückzuführen ist. Sie sind in den Abb. 15—17 dargestellt. Eine Interpretation ihres Zustandekommens ergibt sich aus den beigegebenen Schemazeichnungen. In all den Fällen, in denen die abweichenden Pachytänkonfigurationen Einblick in die Struktur der beteiligten Chromosomen gestatten, ist ihre

Identifizierung möglich. Es lassen sich in diesen Figuren die umgebauten Chromosomen von den ungeschädigten unterscheiden (vgl. Abb. 18).

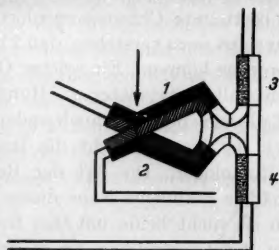
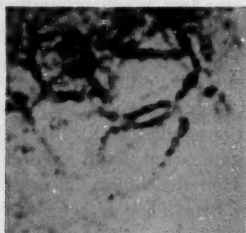


Abb. 15. Reziproke Translokation zwischen den Chromosomen Nr. 4 (1—2) und 9 (3—4). Gleichzeitig ist im Chromosom Nr. 4 eine Inversion im Heterochromatin abgelaufen (Pfeil). Von den insgesamt 4 Brüchen liegen 2 in den Insertionsstellen und 2 im Heterochromatin (500 r, fixiert nach 3 Tagen).

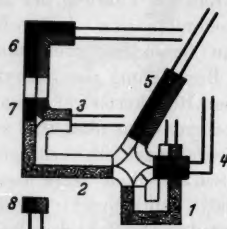


Abb. 16. Eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen Nr. 7 (1—2—3) und 10 (4—5). Gleichzeitig ist zwischen dem Chromosom Nr. 7 und 2 nicht identifizierbaren, homologen Chromosomen (6—7—8) eine 3-Bruch-Restitution abgelaufen. Es sind also insgesamt 5 Brüche auf 4 Chromosomen zustande gekommen, von denen 2 in den Insertionsstellen und 3 im Heterochromatin liegen (700 r, fixiert nach 3 Tagen).

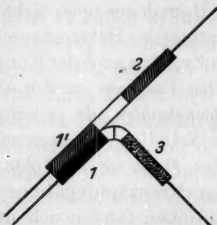


Abb. 17. Dreischenkliges Pachytänfigur mit Konjugationsstörung. Nur 1 Schenkel der Figur (1—1') zeigt die normale Parallelkonjugation homologer Chromosomensegmente. Die Schenkel 2 und 3 sind mit Sicherheit nicht homolog. Der Figur liegt wahrscheinlich eine nicht reziproke Translokation zugrunde (500 r, fixiert nach 3 Tagen).

b) Die Bestrahlung des Pachytäns.

Das Pachytän ist eines der längsten meiotischen Stadien. Seine Dauer beträgt unter den vorliegenden Versuchsbedingungen etwa 1 bis

1½ Tage. Um einen Einblick in die Wirkung der Röntgenstrahlen auf das Pachytän zu gewinnen, wurden auch Knospen von Pflanzen dieser Versuchsreihe nach 6 Std fixiert. Das bedeutet, daß die Kerne, die zum Zeitpunkt der Fixierung im Pachytän stehen, sich auch zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits im Pachytän befanden. Wir finden in diesen bestrahlten Pachytänkernen 3 Störungstypen, die im folgenden beschrieben werden sollen, nämlich Chromosomenmutationen, „half starvation“ und lokale Entspiralisierungen gewisser euchromatischer Partien.

Die Chromosomenmutationen. Als Folge der Bestrahlung des Teilungskernes erwarten wir an Chromosomenmutationen ausschließlich Fragmentationen (MARQUARDT 1938). Merkwürdigerweise wurden echte Fragmente im Pachytän nur äußerst selten angetroffen. Im gesamten Material traten nur 2 Fragmentationen in einem Bivalent auf, in dem beide Homologe in der Insertionsstelle gebrochen waren. Es handelte sich dabei jedoch um eine randständige Zelle im Quetschpräparat, und es ist sehr wahrscheinlich, daß diese „Fragmentation“ beim Anfertigen des Präparates zustande gekommen ist. Untersuchungen späterer meiotischer Stadien (Diakinese und Telophase) erbrachten jedoch einen mit anderen Objekten durchaus vergleichbaren Prozentsatz von Fragmentationen (11,3% in der Diakinese, 7,2% in der Telophase). Es liegt also keine besondere Resistenz von *Solanum lycopersicum* gegenüber den Röntgenstrahlen vor. Die Fragmentationen sind ohne Zweifel auch im Pachytän vorhanden, sie treten nur in diesem Stadium infolge der Parallelkonjugation der Homologen nicht in Erscheinung.

Viel wesentlicher ist die Tatsache, daß auch nach Bestrahlung des Pachytäns echte Chromosomenumbauten auftreten, und zwar alle Typen, die nach MARQUARDT (1938, 1941) in der Mitose ausschließlich nach der Bestrahlung von Ruhekernen auftreten, nämlich reziproke Translokationen, Deletionen, Inversionen und die dreischenkelligen Konfigurationen. Die Zahl dieser Aberrationen ist zwar im Vergleich zu den im Ruhekern induzierten Chromosomenmutationen sehr gering, sie ist aber doch so hoch, daß sie mit Sicherheit auf die Wirkung der Röntgenstrahlen während des Pachytäns zurückzuführen ist. An spontan aufgetretenen Aberrationen fand sich in der Kontrolle nur eine einzige Fragmentation. Im Röntgenversuch hingegen traten in einem Material von gleichem Umfang wie der Kontrolle 15 Kreuzkonjugationen, 1 Deletion, 1 Inversion und 3 Drei-Bruch-Restitutionen auf. Die Zahl der wirklich zustande gekommenen Aberrationen dürfte aber noch höher sein, weil ein großer Teil der Aberrationen in den unübersichtlichen Pachytänkernen der Beobachtung entgeht. Irgendwelche Unterschiede zwischen den im Pachytän und den im prämeiotischen Ruhekern induzierten Chromosomenumbauten konnten nicht festgestellt werden.

Die „half-starvation“. Eine zweite Erscheinung, die sich als Folge der Röntgenbestrahlung im 6-Std-Versuch fand, ist die half-starvation (DARLINGTON 1947), also ein Mangel oder das völlige Fehlen von Desoxyribose-Nukleinsäure an einzelnen Chromosomenabschnitten. Die Erscheinung tritt bei *Solanum lycopersicum* sehr selten auf und ist nur im Heterochromatin sichtbar. In den ohnehin nur sehr schwach färbaren euchromatischen Enden kann der Unterschied, den ein lokaler Nukleinsäuremangel zustande bringt, nicht beobachtet werden. In den wenigen Fällen, in denen die „half-starvation“ beobachtet wurde, betraf sie nur eine sehr kurze Region eines der beiden Homologen oder auch der beiden gepaarten Chromosomen. Man hat zunächst den Eindruck einer kurzen Deletion, stellt aber bei genauer Beobachtung fest, daß die beiden Chromosomenteile, die voneinander getrennt zu sein scheinen, durch einen manchmal kaum sichtbaren feinen Faden miteinander in Verbindung stehen. In Abb. 5 betrifft die half-starvation eine etwas längere Chromosomenregion, und hier ist der Verbindungsfaden zwischen den beiden ungeschädigten heterochromatischen Partien des linken Chromosomenschenkels in Form einer Spirale sogar im Photo deutlich sichtbar (Pfeil). Es handelt sich bei dieser Spirale offenbar um die Chromonemen der beiden Homologen, die durch eine schwache Auflagerung von Nukleinsäure nur wenig färbbar sind. Um eine lokale Entspiralisation (unten) von euchromatischen Partien, die sich zwischen den Makrochromomeren befinden, kann es sich in diesem Falle nicht handeln, denn die schwach gefärbten Spiralwindungen sind deutlich sichtbar. Sie laufen der Anordnung der Makrochromomeren genau parallel, es hat sich also am Spiralisationsgrad des Chromosoms auch in der schwach gefärbten heterochromatischen Region nichts geändert. Es liegt ohne Zweifel eine echte „half-starvation“ im Sinne DARLINGTONS vor.

Lokale Entspiralisationen. Sehr häufig tritt, auch in den im Ruhekern bestrahlten Pollenmutterzellen, ein anderer Störungstypus auf, der in seinem Erscheinungsbild eine gewisse Ähnlichkeit mit der half-starvation hat und in Form einer Auflockerung der heterochromatischen Mittel-segmente in Erscheinung tritt. Dabei bleibt im Gegensatz zur half-starvation die Zahl der Makrochromomeren unverändert erhalten, es wird lediglich die Aufspiralisation der kurzen euchromatischen Segmente, die im Zygotän zwischen den Makrochromomeren liegen, gelockert. Sie treten dadurch auch im Pachytän als euchromatische Brücken zwischen den Makrochromomeren wieder auf und bewirken die Auflockerung des Heterochromatins.

Die sonst als Folge der „unspezifischen physiologischen Störungen“ (MARQUARDT 1949) nach der Bestrahlung von Teilungskernen reichlich auftretenden Verklebungen werden im Pachytän bei einer Fixierungs-

zeit von 6 Std nach der Bestrahlung nicht gefunden. Sie treten nur in Meta- und Anaphasen von Zellen auf, die 3 Tage nach der Bestrahlung fixiert wurden.

c) *Die Lage der Bruchstellen im Chromosom.*

Die Längsgliederung eines partiell heterochromatischen Chromosoms ist gegeben durch die morphologisch faßbaren Verschiedenheiten zwischen Euchromatin, Heterochromatin und Insertionsstelle. Es soll im folgenden festgestellt werden, ob diese 3 Chromosomenregionen in der gleichen Weise auf die Einwirkung der Röntgenstrahlen reagieren oder ob sich Verschiedenheiten in der Resistenz gegenüber der Bestrahlung nachweisen lassen. Das Pachytän eignet sich für diese Untersuchungen besonders gut, denn die Chromosomen sind in diesem Stadium noch wenig spiralisiert, und die Lage der Bruchstellen kann infolge der deutlich in Erscheinung tretenden Längsstruktur der partiell heterochromatischen Chromosomen exakt ermittelt werden. Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß die Brüche unmittelbar nach ihrer Entstehung untersucht werden können. Es werden dabei nicht nur die Aberrationen erfaßt, die später Verteilungsstörungen bedingen, sondern alle Brüche, die zu sichtbaren Umbauten geführt haben.

Für diese Untersuchungen ist es notwendig, in den anomalen Pachytänkonfigurationen die Lage der an der Restitution beteiligten Einzelbrüche auf den Chromosomen zu bestimmen. Die für eine Translokation notwendigen 2 Brüche können auf beiden Chromosomen in der gleichen oder in verschiedenen Regionen liegen. Wenn die Bruchstellen nach euchromatischen, heterochromatischen und kommissuralen unterschieden werden, so sind 6 Kombinationsmöglichkeiten gegeben:

A) *Beide Bruchstellen liegen in der Insertionsstelle.* Der Kreuzungspunkt der Paarungsfigur liegt an den Insertionsstellen der 4 beteiligten Chromosomen, und die 4 Schenkel der Figur haben das Aussehen normaler Chromosomenschenkel (Abb. 18 und 19).

B) *Beide Bruchstellen liegen im Heterochromatin.* Der Translokationspunkt liegt im heterochromatischen Mittelteil der Chromosomen, die an dieser Stelle etwas ausgezogen sein können. Dadurch kann ein Umbau an der Insertionsstelle vorgetauscht werden. Tatsächlich läßt sich aber bei 2 der 4 Schenkel in ihrem heterochromatischen Teil die Insertionsstelle nachweisen.

C) *Beide Brüche liegen im Euchromatin.* Zwei Schenkel der Figur sind rein euchromatisch, die beiden anderen beginnen am Kreuzungspunkt ebenfalls euchromatisch, setzen sich aber in 2 vollständige heterochromatische Mittel-segmente mit je einer Insertion fort.

D) *Rekombination zwischen einer heterochromatischen Bruchstelle und einer solchen in der Insertion.* Der Translokationspunkt fällt mit der Insertionsstelle des einen Chromosoms zusammen und zeigt oft eine deutliche Verzerrung an der Stelle des Partnerwechsels. Drei Schenkel der Konfiguration sind normale Chromosomenschenkel, der 4. Arm zeigt in seinem heterochromatischen Teil eine Insertion.

E) *Rekombination zwischen einer euchromatischen Bruchstelle und einem Insertionsbruch.* Zwei Schenkel sind normal, einer ist rein euchromatisch, der vierte beginnt am Kreuzungspunkt euchromatisch und setzt sich in einen vollständigen heterochromatischen Mittelteil mit Insertionsstelle fort.

F) *Rekombination zwischen einer euchromatischen und einer heterochromatischen Bruchstelle.* Ein Schenkel der Paarungsfigur ist rein euchromatisch, der zweite ist ein normaler Chromosomenschenkel. Der 3. Schenkel der Figur beginnt heterochromatisch am Kreuzungspunkt, besitzt aber eine Insertionsstelle in seinem heterochromatischen Segment. Der 4. Schenkel schließlich besitzt ebenfalls einen



Abb. 18. Kreuzkonjugation, der eine reziproke Translokation zwischen dem Satellitenchromosom (1-2) und dem Chromosom Nr. 4 (3-4) zugrunde liegt. Beide Bruchstellen liegen in den Insertionsstellen der aberrierten Chromosomen (500 μ , fixiert nach 3 Tagen).



Abb. 19. Reziproke Translokation zwischen den Chromosomen Nr. 2 und 3. Beide Bruchstellen liegen in den Insertionen (500 μ , fixiert nach 3 Tagen).

vollständigen heterochromatischen Mittelteil mit Insertion, beginnt aber am Kreuzungspunkt euchromatisch.

In Konfigurationen, deren Translokationspunkt bei beiden Chromosomen im Heterochromatin liegt, kann dieser durch eine lokale Entspiralisierung der zwischen den Makrochromomeren liegenden kurzen euchromatischen Partien etwas gedehnt werden. Er läßt sich dann morphologisch nur schwer von einem Translokationspunkt unterscheiden, der für beide translozierte Chromosomen in der Insertionsstelle liegt. Der Gruppe A wurden, um die hierdurch geschaffene Fehlermöglichkeit auszuschalten, nur diejenigen Kreuzkonjugationen zugeordnet, in deren 4 Schenkeln sich mit Sicherheit keine Insertionsstelle befand.

In gleicher Weise wurde die Lage der Bruchstellen von Deletionen und Inversionen ermittelt. Etwas schwieriger liegen die Verhältnisse bei den oben beschriebenen 3-Bruch-Restitutionen. Hier ist die Lage aller 3 Brüche nur dann mit Sicherheit festzustellen, wenn besonders charakteristische Chromosomen des Genoms am Bau der Figur beteiligt sind, deren Identifizierung keine Schwierigkeiten bereitet. Oftmals läßt sich mit Sicherheit nur der Bruch des Chromosoms lokalisieren, dessen Homologes das ungeschädigte Chromosom der Figur darstellt. In den aufgefundenen komplizierteren Aberrationen ließ sich die Lage der Bruchstellen ebenfalls ermitteln.

Die oben angeführten 6 theoretisch möglichen strukturellen Typen von Kreuzkonjugationen wurden in unserem Material aufgefunden. Das Zahlenverhältnis, in dem sie auftreten, zeigt jedoch eine starke Förderung der Kombinationen, bei denen der Translokationspunkt mit der Insertionsstelle zusammenfällt (Tabelle 4). Von insgesamt 299 analysierbaren Kreuzkonjugationen gehören

Tabelle 4. Übersicht über die in den Röntgenversuchen aufgefundenen Pachytänkonfigurationen.

	Gesamtzahl der aufgefundenen Konfigurationen	Konfigurationstypen										
		Kreuzkonjugationen						3-Bruch-Restitutionen	Deletionen	Inversionen	höhere Konfigurationen	
		Gesamtzahl der Kreuzkonjugationen	Verteilung auf die verschiedenen Typen ¹									
			A	B	C	D	E					F
Anzahl	346	308	197	15	14	49	13	11	17	14	2	5
Prozentsatz von der Gesamtzahl	100%	89,0%							4,9%	4,0%	0,6%	1,5%

Die Summe der Kreuzkonjugationen der Typen A bis F beträgt nur 299. Die zur Gesamtzahl noch fehlenden 9 Kreuzkonjugationen konnten infolge der Unübersichtlichkeit der betreffenden Kerne nicht so exakt analysiert werden, daß ihre Einordnung in die 6 Klassen möglich war.

197 der Gruppe A an, auch auf die Gruppe D (eine Bruchstelle in der Insertion) entfällt ein relativ großer Anteil (49 Fälle).

Im Gesamtmaterial unserer Röntgenversuche wurden 346 Chromosomenmutationen mit insgesamt 718 Bruchstellen analysiert, von denen 697 mit Sicherheit lokalisiert werden konnten. Aus der Tabelle 5 geht der Anteil der einzelnen Komponenten hervor. An Hand dieses Materials lassen sich zuverlässige Aussagen über die Verteilung der Bruchstellen auf die genannten 3 Chromosomenregionen machen. Es ist angebracht, die Bruchhäufigkeit dieser unterscheidbaren Regionen zunächst an einem besonders charakteristischen Chromosom des Genoms zu ermitteln. Für diese Untersuchungen ist das *Satellitenchromosom* besonders geeignet, denn es bietet im Hinblick auf unsere Fragestellung verschiedene Vorteile: Seine Identifizierung ist von vornherein gegeben, Fehlentscheidungen sind unmöglich; der Bruch läßt sich durch die klare Gliederung vor allem des heterochromatischen Teils des Chromosoms exakt lokalisieren, und die Insertionsstelle des Chromosoms ist im Normalfall lang ausgezogen und dadurch gut sichtbar. Unmittelbar vor der Insertionsstelle liegen auf dem, dem Nukleolus zugekehrten Schenkel 2 Makrochromomeren, die sich durch ihre Größe deutlich von den anderen Chromomeren

dieser Region abheben. An ihnen kann man auch in den Fällen, in denen die Insertionsstelle nicht so charakteristisch ausgebildet ist, ihre Lage im Chromosom zuverlässig ermitteln. Ein weiterer Vorteil besteht schließlich noch in präparativer Hinsicht: Beim Herstellen des Quetschpräparates wird der Nukleolus oft etwas an die Peripherie des Kernraums gedrückt; er liegt dann mit dem heterochromatischen Teil des SAT-Bivalenten frei und ist nicht mit den anderen Chromosomen verknäult. Es werden deshalb Aberrationen, die im Satellitenchromosom

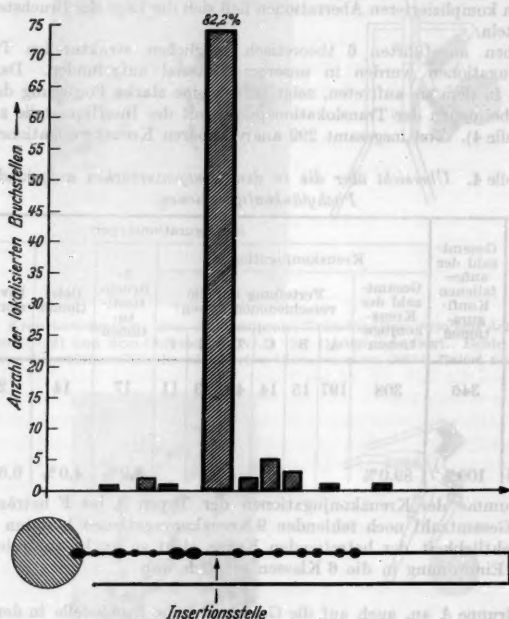


Abb. 20. Die Verteilung der durch Röntgenbestrahlung induzierten Brüche in 90 aberranten Satellitenchromosomen von *Solanum lycopersicum*. Auf der Ordinate ist die Anzahl der lokalisierten Bruchstellen, auf der Abszisse die Lage der Brüche im Chromosom angegeben. Die Schemazeichnung unter der Abszisse gibt die Struktur des Satellitenchromosoms wieder.

aufgetreten sind, oftmals auch dann noch beobachtet werden können, wenn der Zustand des Kerns die Beobachtung der anderen Bivalente ausschließt.

Unter den insgesamt vorgefundenen 346 Aberrationen befinden sich 90 Figuren, an deren Bildung das Satellitenchromosom beteiligt ist. Bei allen lassen sich die Brüche dieses Chromosoms so exakt lokalisieren, daß sie eine zuverlässige Grundlage für die Klärung der Frage nach der Bruchverteilung darstellen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abb. 20 zusammengestellt, die außer der Zahl auch die Lage der Brüche innerhalb des Satellitenchromosoms enthält.

Das unter der Abszisse gezeichnete SAT-Chromosom gibt schematisch dessen Bau wieder. Unter der Voraussetzung einer gleichmäßigen Bruchbeteiligung aller Chromosomenregionen dürfte keine Bevorzugung einer der 3 Regionen hinsichtlich der Bruchhäufigkeit vorliegen. Aus der Abbildung ergibt sich jedoch eindeutig, daß im Gegensatz zu den an *Drosophila* und auch an einer Reihe pflanzlicher Objekte ermittelten Befunden bei *Solanum lycopersicum* die Insertion beim Auftreten von Chromosomenbrüchen gegenüber den anderen Chromosomenregionen deutlich bevorzugt ist. 74 Brüche, das sind 82,2% der Gesamtzahl, liegen in der Insertion. Der Begriff „Insertionsstelle“ ist jedoch in diesem Zusammenhang nicht identisch mit dem eigentlichen „Zentromer“, sondern umfaßt die nichtfärbbare Chromosomenregion beiderseits des Zentromers zwischen den beiden heterochromatischen Abschnitten des Chromosoms. Auch bei den anderen Chromosomen findet sich eine derartige Verteilung der Bruchstellen (Tabelle 5). Zusammenfassend ergibt sich, daß 73,2% aller lokalisierbaren Brüche des untersuchten Gesamtmaterials in der Insertionsstelle liegen.

Tabelle 5. Übersicht über die Anzahl und Lage der lokalisierbaren Bruchstellen in den Pachytänkfigurationen der Röntgenversuche.

Konfigurationstypus	Anzahl der Konfigurationen	Anzahl der vorhandenen Bruchstellen	Anzahl der lokalisierbaren Bruchstellen	Lage der Bruchstellen im Chromosom			Zeitpunkt der Bestrahlung	
				Insertionsstelle	Heterochromatin	Euchromatin	Ruhekern	Pachytän
Kreuzkonjugationen.	308	616	606	464	96	46	576	30
3-Bruch-Restitutionen	17	51	41	28	11	2	34	7
Deletionen	14	28	28	9	12	7	26	2
Inversionen	2	4	4	1	1	2	2	2
Höhere Konfigurationen	5	19	18	8	8	2	18	—
Gesamtzahlen	346	718	697	510	128	59	656	41
Prozentsätze	—	—	100%	73,2%	18,4%	8,4%	—	—

Der Vergleich zwischen Hetero- und Euchromatin ergibt bereits zahlenmäßig eine schwächere Bruchbeteiligung des Euchromatins, die noch dadurch gesteigert wird, daß das Euchromatin in seiner Gesamtheit in den Pachytänchromosomen wesentlich länger ist als das Heterochromatin. Bei gleichmäßiger Verteilung müßte die Zahl der Brüche im Euchromatin also höher sein als im Heterochromatin. Die Untersuchungen ergaben aber einen um mehr als die Hälfte niedrigeren Betrag. Die Anzahl der Brüche im Euchromatin kann jedoch nicht als eine vergleichbare Zahl angesehen werden, denn in den oft recht unübersichtlichen Pachytänkernen werden gerade in den langen, schwach gefärbten

euchromatischen Enden zwangsläufig Bruchstellen leichter übersehen werden als im Heterochromatin. Wie aber besonders die Verhältnisse am Satellitenchromosom zeigen, bei denen von 90 Bruchstellen nur eine einzige im Euchromatin liegt, ist ein Unterschied ohne Zweifel vorhanden.

Die Dosisabhängigkeit konnte bei der qualitativen Auswertung unserer Versuche nicht bestimmt werden. Ebenso sind zwischen Umbauten, die im prämeiotischen Ruhekern, und solchen, die im Pachytän induziert wurden, keine Unterschiede aufzufinden. Den Tabellen wurde daher die Gesamtzahl der aufgefundenen Aberrationen zugrunde gelegt, unabhängig davon, in welchem meiotischen Stadium und durch welche Röntgendosis sie zustande gekommen sind.

Die späten Stadien der Meiosis. Fixiert man die späteren Stadien der Meiosis 3 Tage nach der Bestrahlung, so handelt es sich um Zellmaterial, das zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits die meiotische Prophase durchlief. Auch in diesen Zellen finden sich die üblichen Störungen des „Primäreffektes“, d. h. für die 1. Meta-, Ana- und Telophase in der Hauptsache Verklebungen und ihre Folgen, die nach MARQUARDT (1938) als Matrixschädigungen anzusprechen sind. In Extremfällen kann die Verklebung einer Metaphasenplatte so stark sein, daß sich die Homologen nicht voneinander lösen. Es kommt aber in diesen Kernen trotzdem zu einer Polwanderung, bei der der ganze verklebte Chromosomenhaufen an einen Pol geht, und es entsteht eine Telophase mit nur einem Tochterkern. Daß es sich in diesen Fällen tatsächlich um echte Telophasen und nicht um verschobene Metaphasenplatten handelt, ergibt sich daraus, daß die Spindel deutlich sichtbar ist und alle Chromosomen an einem Pol dieser Spindel liegen. Es handelt sich bei diesen Verklebungen also um einen „Primäreffekt“, der wiederum nicht sofort, sondern erst 3 Tage nach der Einwirkung der Röntgenstrahlen in Erscheinung tritt, in einem Stadium also, in dem sich die Chromosomen mit einer Matrix umgeben haben und dadurch die Verklebung akut werden kann. So finden wir also hier wiederum, wie bei den oben beschriebenen 3-Bruch-Restitutionen, eine Verzögerung des Effektes. Während der Interphase geben nun die Chromosomen ihre Matrix wieder ab, damit verschwindet die Ursache der Verklebung: der Telophasen-kern lockert sich auf. Da in diesem Interphasenkern die Reduktion der Chromosomenzahl unterblieben ist, ist er diploid, enthält 24 Chromozentren und ist von einem prämeiotischen Ruhekern nur durch seine geringere Größe und seine Randlage in der Pollenmutterzelle zu unterscheiden.

D. Theoretischer Teil.

I. Die Variabilität der Pachytänchromosomen.

Die Chromosomen besitzen in ihrem inneren Aufbau eine Längsstruktur, die nach den bisherigen Erkenntnissen konstant und für jedes Chromosom charakteristisch ist. Diese Individualität schließt jedoch nicht ein, daß bestimmte Chromosomen in verschiedenen Kernen auch in ihrer morphologischen Ausprägung absolut identisch sein müssen. Es ergeben sich vielmehr als Folge des Formwechsels der Chromosomen während der Kernteilung im gleichen Entwicklungsstadium, etwa im Pachytän, zum Teil recht erhebliche morphologische Differenzen zwischen identischen Chromosomen aus verschiedenen Kernen. Im

experimentellen Teil ließ sich zeigen, daß die Zahl der Makrochromomeren unter den Strukturelementen des Chromosoms die größte Konstanz aufweist, während Symmetrieverhältnisse und Länge so stark variieren können, daß die Identifizierung des Einzelchromosoms sehr erschwert, in Extremfällen sogar unmöglich gemacht werden kann. In der Tabelle 3 wurde gezeigt, daß die in der Tabelle 2 wiedergegebene Größenstaffelung der Chromosomen nicht in allen Kernen eingehalten wird. Beim Vergleich zweier bestimmter Chromosomen aus verschiedenen Kernen kann vielmehr das gegenseitige Größenverhältnis umschlagen. Für diese Erscheinung sind 2 Ursachen möglich:

1. Das Größenverhältnis zwischen 2 bestimmten Chromosomen kann beim Anfertigen des Quetschpräparates verschoben werden, wenn eines der beiden Chromosomen durch Druck oder Zug in seiner Längsausdehnung verändert wird. Es wäre in diesem Fall die in vielen Kernen beobachtete Verschiebung eine Folge der Präpariertechnik.

2. Die Verschiedenheiten können auch im lebenden Kern vorhanden sein.

In Schnittpräparaten, bei deren Herstellung eine Verzerrung ausgeschaltet ist, können keine Längenmessungen von Pachytänchromosomen durchgeführt werden. Andererseits ist eine Dosierung des Druckes bei der Herstellung von Quetschpräparaten in der Art, daß alle Zellen und Zellbestandteile in gleicher Weise belastet werden, nicht möglich. In allen Zellen, die nur gequetscht, nicht vollständig zerstört werden, erfährt das Chromosom keinen unmittelbaren Druck, denn die Nukleolen wirken, wie Messungen ergeben haben, in einem Quetschpräparat als knapp 2μ hohe Säulen, auf denen das Deckglas ruht. Der Querdurchmesser des Heterochromatins eines ungequetschten Pachytänbivalentes liegt mit $0,8-1\mu$ erheblich unterhalb der Nukleolenhöhe. Auf diese Weise kann die Länge des Chromosoms also nicht beeinflußt werden. Viel wahrscheinlicher ist es, daß durch das Quetschen des Kerns Chromosomen, die ineinander verhakt sind, gedehnt werden können, indem die bereits begonnene Spiralisierung wieder gelockert wird. Für lange Chromosomen, die einen großen Teil des Kerns durchziehen, ist dies sehr wahrscheinlich. In der Tabelle 3 wurde die Variabilität des Längenverhältnisses aber gerade am Beispiel der beiden kleinsten Chromosomen des Genoms aufgezeigt. Sie sind mit einer Durchschnittslänge von etwa 20μ rund 5mal so lang wie der Durchmesser eines ungequetschten Nukleolus. Es ist kaum anzunehmen, daß die zum Teil beachtliche Verschiedenheit der Differenzen zwischen diesen beiden kleinen Chromosomen auf Quetscheffekte zurückzuführen ist. In gleicher Weise gilt dies auch für den Vergleich identischer Einzelchromosomen aus verschiedenen Kernen, wie die Untersuchungen über die Veränderung der Symmetrieverhältnisse gezeigt haben.

Da durch die Präparationstechnik also nur ein Teil der Verschiebungen im Längenverhältnis der Chromosomen eines Kerns erklärt werden kann, muß auch die zweite als möglich genannte Ursache geprüft werden. *Es ist sehr wahrscheinlich, daß die aufgezeigten Differenzen bereits im lebenden Kern vorhanden sind. Das bedeutet aber, daß der Spiralisationsprozeß wohl für alle Chromosomen im Leptotän gleichzeitig*

einsetzt, daß aber der Ablauf der Spiralisierung vom Kern nur in lockerer Weise gesteuert wird, innerhalb der nicht nur den Chromosomen, sondern sogar größeren Regionen innerhalb der Chromosomen eine gewisse Selbständigkeit zugestanden werden muß. Das vorliegende Material und die Untersuchungsmethode reichen aber nicht aus, um über Einzelheiten dieses Vorgangs eine endgültige Aussage zu machen.

II. Primär- und Sekundäreffekt in der Meiosis.

Die Wirkung mutationsauslösender Agenzien manifestiert sich in der Mitose in verschiedener Weise, je nachdem, ob Ruhekerne behandelt werden oder Kerne, die bereits die Teilung durchlaufen. Diese Unterschiede sind von einer Reihe von Autoren für alle bisher bekannten mutagenen Agenzien nachgewiesen worden. So unterscheiden schon ALBERTI und POLITZER (1923, 1924) und später vor allem MARQUARDT (1937, 1938) bei der Einwirkung von Röntgenstrahlen auf pflanzliche Mitosen zwischen einem *Primäreffekt*, der bei der Bestrahlung von Mitosekernen zutage tritt, und einem *Sekundäreffekt*, dessen Wirkungen sich zeigen, wenn man den Ruhekern bestrahlt. Diese Unterschiede treten nicht allein nach Röntgenbestrahlung auf, sondern in gleichem Maße bei der Einwirkung verschiedenartigster Agenzien auf die Zelle. MARQUARDT (1949) bezeichnet alle diese Reaktionen der Zelle, in weitgehender Übereinstimmung mit LEA (1946), an Stelle des Primäreffektes als „unspezifisch physiologische Störungen“ und setzt die „Ruhekerngiftstörung“ dem früheren Sekundäreffekt gleich. Der tiefgreifendste Unterschied zwischen den beiden Effekten liegt darin, daß echte Chromosomenumbauten, also Translokationen, Deletionen, Inversionen u. a. nur im Sekundäreffekt auftreten, d. h. durch eine Beeinflussung des Ruhekerns induziert werden. Diese Meinung vertreten vor allem MARQUARDT (1937, 1938, 1949), ERNST (1938), KOLLER (1947b) und DARLINGTON und KOLLER (1947). Der Primäreffekt hingegen wird gekennzeichnet durch Verklebungen und eine Reihe anderer, weniger tief eingreifender Erscheinungen. Nur die Fragmentationen finden sich sowohl im Primär- als auch im Sekundäreffekt (MARQUARDT 1938).

In neuerer Zeit hat MARQUARDT (1949) nach der Einwirkung eines Äthylurethan-KCl-Gemisches auf die meiotische Prophase von *Paeonia tenuifolia* jedoch echte Translokationen in geringen Prozentsätzen gefunden. Auch die durch das gleiche mutagene Gemisch von LINNERT bei *Oenothera* (1950a) und bei *Zea Mays* (1950b) induzierten Chromosomenmutationen sind durch den Angriff der Substanzen im Pachytän zustande gekommen. Die Röntgenversuche an *Solanum lycopersicum* haben nun ebenfalls ergeben, daß alle Formen echter Chromosomenumbauten auch im Pachytän induziert werden können. Die Aberrationen, die sich in diesen Kernen fanden, unterscheiden sich in keiner Weise von

denen, die durch Bestrahlung prämeiotischer Ruhekerne erhalten wurden, sie treten bei *Solanum lycopersicum* nur sehr viel seltener auf.

Überraschend war die geringe Anzahl von Fragmentationen, die sich im Pachytän nachweisen ließ, obwohl sie ohne Zweifel auch dort vorhanden sein müssen. Die vollständige Parallelkonjugation der homologen Chromosomen läßt die Fragmentationen im Pachytän nicht sichtbar werden. Es bestehen gewisse Anzeichen dafür, daß sich die beiden homologen Chromosomen während des Pachytäns *nicht nebeneinander, sondern gewissermaßen miteinander spiralisieren*. In der Abb. 5 zeigt das rechts vom Nukleolus liegende Chromosom eine „half-starvation“ im Heterochromatin. Es ist aber offensichtlich durch die Wirkung der Röntgenstrahlen nicht alle Nukleinsäure gelöst worden, sondern es läßt sich noch eine Spirale erkennen, die wir als die durch eine geringe Auflagerung von Nukleinsäure färbbar gewordenen Chromonemen interpretieren. Diese Chromonemen zeigen deutlich einen spiraligen Verlauf. Es ist aber nur *eine* Spirale sichtbar, deren Durchmesser jedoch nicht nur dem Querdurchmesser des Heterochromatins *eines* Chromosoms, sondern dem des gesamten Bivalents entspricht. Die Chromonemen der beiden Homologen sind also offenbar eng parallel gelagert und führen den Vorgang der Spiralisierung während des Pachytäns gemeinsam durch, sonst müßten 2 Spiralen nebeneinander sichtbar sein, von denen jede nur den Querdurchmesser eines Chromosoms hat. Nach dieser Vorstellung würde die Spiralisierung des Pachytänbivalents etwa in der gleichen Weise ablaufen wie die gemeinsame Spiralisierung der beiden Chromatiden eines Chromosoms, also in der Form einer Anorthospirale. Eine Trennung der beiden Homologen nach der Konjugation ist bei diesem Spiralisationsstypus leicht möglich. Es wäre bei dieser eng benachbarten Lagerung der Chromonemen homologer Chromosomen auch die Chiasmenbildung, die während des Pachytäns vor sich geht, leichter vorstellbar.

Diese Deutung wird noch dadurch gestützt, daß die in Abb. 5 sichtbaren Spiralwindungen offenbar eine Fortsetzung der Makrochromomeren darstellen, die lediglich schwächer gefärbt sind. Die Lagerung homologer Makrochromomeren erfolgt merkwürdigerweise in der Mehrzahl aller Pachytänbivalente nicht genau senkrecht zur Längsachse des Bivalents, wie das an sich zu erwarten wäre, sondern etwas schräg dazu (Abb. 10, Chromosom Nr. 5; Abb. 11, Chromosom Nr. 12). Diese Beobachtung macht auch NAITHANI (1937) an Pachytänchromosomen von *Hyacinthus*. Er schließt daraus, daß die als „Chromomeren“ bezeichneten Gebilde gar nicht als Strukturmerkmale der Chromosomen vorhanden sind, sondern daß sie optische Schnitte von Spiralwindungen darstellen, die durch 2 ineinandergeschobene Spiralen in dieser charakteristischen Anordnung zustande kommen. Mit der oben vertretenen Ansicht läßt

sich die Seltenheit der Fragmentationen im Pachytän interpretieren: Wenn eines der beiden Homologen durch eine Bestrahlung des Pachytäns fragmentiert wird, so wird das Fragment durch den gemeinsam ablaufenden Spiralisationsprozeß am ungeschädigten Homologen festgehalten und kann daher im Pachytän nicht als isoliertes Chromosomenstück in Erscheinung treten. Wir werden Fragmente nur dann erfassen können, wenn die beiden gepaarten Homologen durch die Einwirkung der Röntgenstrahlen an der gleichen Stelle gebrochen sind, so daß wirklich eine Abtrennung eines Stückes vom Bivalent zustande kommt. In unserem gesamten Material fand sich dies nur in einem Fall, es waren beide Satellitenchromosomen in der Insertionsstelle fragmentiert. Dazu kommt noch ein anderer sehr wesentlicher Punkt: In keinem meiotischen Stadium wird bei der großen Restitutionsfähigkeit freier Bruchflächen eine Restitution zum Normalzustand so leicht zu bewerkstelligen sein wie gerade im Pachytän. *Hier bleiben durch den Vorgang der Parallelkonjugation die beiden Bruchflächen nicht nur nahe beieinanderliegen, sondern sie werden infolge der Spiralisation im Verlauf des Pachytäns einander noch genähert.* Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß ein großer Teil der im Pachytän abgelaufenen Fragmentationen innerhalb der 6 Std, die zwischen Bestrahlung und Fixierung liegen, zu Restitutionen geführt hat. Nach DARLINGTON und KOLLER (1947) sind Fragmente in der Meiosis ohnehin wesentlich seltener als in der Mitose. Daß die angewandte Röntgendosis (300 r) hoch genug ist, um Fragmentationen herbeizuführen, wurde an der Telophase nachgewiesen.

Eine der typischsten Erscheinungsformen des Primäreffekts sind Verklebungen aller Art. In Pachytänkernen wurden merkwürdigerweise keine Anzeichen von Verklebungen gefunden, auch nicht an den Insertionsstellen und den Chromosomenenden, die besonders zur Verklebung neigen (DARLINGTON und KOLLER 1947, MARQUARDT 1949). Es wäre zunächst denkbar, daß die Wahl des Fixierungszeitpunktes falsch war, daß also die Verklebungen kurz nach der Bestrahlung vorhanden waren und zum Zeitpunkt der Fixierung, also 6 Std nach dem Versuch, schon wieder rückgängig gemacht worden sind. Das scheint aber nicht der Fall zu sein. Nach MARQUARDT (1938) sind Verklebungen vor allem auf eine Schädigung der Matrix zurückzuführen. Die Anlagerung von Matrixsubstanz nimmt aber im Verlauf der mitotischen und meiotischen Prophase zu (STRAUB 1939) und erreicht am Metaphasechromosom ihr Maximum. Es wäre denkbar, daß die Pachytänchromosomen erst relativ wenig Matrixsubstanz angelagert haben und aus diesem Grund weniger zu Verklebungen neigen als die Metaphasechromosomen. Tatsächlich treten Verklebungen in der Meta- und Anaphase auch noch 3 Tage nach der Bestrahlung auf, es liegt also zwischen Behandlung und sichtbarer Wirkung eine relativ lange Zwischenzeit. Dies ist nur

so zu verstehen, daß die Ursache für die Matrixverklebung schon in einem frühen Stadium gesetzt wird, aber erst wirksam werden kann, nachdem die Matrix die für die Verklebbarkeit notwendige Konsistenz aufweist. Eine Verzögerung des Effektes haben wir aber auch bereits bei der Deutung der 3-Bruch-Restitutionen annehmen müssen, soweit sie im Ruhekern induziert worden sind. Dies gibt zumindest einen Hinweis darauf, daß die Röntgenstrahlen zunächst auf den physiologischen Zustand des Zytoplasmas einwirken und erst sekundär Veränderungen am Chromosom herbeiführen.

Die half-starvation. Die „half-starvation“ (DARLINGTON 1947) kennzeichnet sich dadurch, daß die Nukleinsäureanlagerung an kurzen Chromosomensegmenten reduziert worden ist oder ganz fehlt. Nach AUERBACH (1943) kommt diesen von Nukleinsäure entblößten Chromosomenloci der Wert von Fragmentationsvorstufen zu. Der gleichen Auffassung ist auch MARQUARDT (1941), wenn er achromatische Lücken in Prophasechromosomen als „unvollständige Fragmentationen“ bezeichnet, die dann im Verlauf der Anaphase und der damit verbundenen stärkeren Beanspruchungen der Chromosomen zu „vollständigen Fragmentationen“ werden können.

Bei *Solanum lycopersicum* ließ sich diese Erscheinung an Pachytänchromosomen nachweisen, gleichgültig, ob sie im Ruhekern oder im Pachytän bestrahlt wurden. Im letzteren Fall muß der Vorgang, der zur half-starvation führt, ein anderer sein: *Es unterbleibt nicht infolge der Bestrahlung die Nukleinsäureanlagerung an bestimmten Stellen des Chromosoms, sondern es kommt ihre Auflösung zustande; denn das Pachytänchromosom war in seinem hetercchromatischen Teil bereits weitgehend mit Nukleinsäure beladen.* Dieses Auflösen von Nukleinsäure in bestimmten, häufig sehr eng begrenzten Chromosomensegmenten könnte darauf hindeuten, daß diese Regionen unmittelbar durch die Wirkung der Röntgenstrahlen geschädigt worden sind. Die Interpretation der Röntgenwirkung von DARLINGTON und KOLLER (1947), wonach die durch eine allgemeine Schädigung des Zytoplasmas hervorgerufenen Veränderungen sekundär sichtbare Wirkungen am Chromosom zustande bringen, kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daß es sich bei der an *Solanum lycopersicum* aufgefundenen half-starvation nicht um eine spezifische Reaktion bestimmter Strukturen des chromosomalen Grundgerüsts handelt, geht daraus hervor, daß homologe Teile zweier konjugierter Chromosomen, von denen anzunehmen ist, daß sie einen identischen Aufbau ihrer physiko-chemischen Struktur besitzen, in verschiedener Weise auf die Bestrahlung reagieren können. Es können beide Homologe an einander entsprechenden Stellen die half-starvation zeigen (Abb. 5), die Wirkung kann aber auch auf eines der beiden Homologen beschränkt bleiben. Findet die gleiche Störung im Euchromatin statt, so bleibt sie

in diesem frühen Stadium in den schwach gefärbten euchromatischen Enden der Beobachtung entzogen.

III. Die Frage nach der Spezifität der Mutationsauslösung.

Bei der Bearbeitung der Chromosomenmutationen ist, neben dem Ablauf des Chromosomenumbaus, die Verteilung der Bruchstellen über das Genom wie auch innerhalb des Einzelchromosoms von besonderem Interesse. Während die Grundlagen zunächst durch die Untersuchung röntgeninduzierter Mutationen erarbeitet wurden, hat die experimentelle Auslösung von Chromosomenmutationen später auch auf Chemikalien und nichtionisierende Strahlen übergegriffen. Dabei ließ sich feststellen, daß sich die Wirkung der verschiedenen mutagenen Agenzien im mikroskopisch faßbaren Bild gleichartig manifestiert.

Bei einer gleichmäßigen Beschaffenheit des Chromosoms und gleicher Resistenz aller Teile gegenüber der schädigenden Wirkung mutagener Agenzien müßte man auf der Grundlage der Treffertheorie eine gleichmäßige Größe der Treffbereiche und damit eine homogene Verteilung der Bruchstellen über das Genom und über das Einzelchromosom erwarten. Das Studium der Arbeiten, die sich mit diesem Problem beschäftigen, ergibt jedoch ein anderes Bild. Eine *gleichmäßige Bruchverteilung* über das gesamte Chromosom hinweg finden VOGT (1948, *Drosophila*; Äthylurethan + KCl), MARQUARDT (1949, *Paeonia*; Äthylurethan + KCl) und FORD (1949, *Vicia faba*; γ -Strahlen). Eine Häufung der Brüche in den *Chromosomenenden* nach Röntgenbestrahlung wird nachgewiesen von BAUER (1939) und KAUFMANN (1939) an *Drosophila*, von MARQUARDT (1941, 1942) für Fragmentationen bei *Bellevalia*, von SWANSON (1943) an *Tradescantia* und von DA CAMARA, WAGNER, GARDÉ (1949) an *Triticum*.

LEVITZKY und SIZOVA (1934, 1935, *Crepis capillaris*), MARQUARDT (1942, I-Bruch-Restitutionen bei *Bellevalia*) und DEUFEL (1951, m-Chromosomen von *Vicia faba*) finden nach Röntgenbestrahlung eine Häufung der Brüche in den *Mittelsegmenten langer Chromosomenschenkel*, das gleiche weist FORD (1949) ebenfalls an den kleinen Chromosomen von *Vicia faba* für die Einwirkung von Senfgas nach. Untersuchungen an *Drosophila* (BAUER 1939, PROKOPIEWA 1939a) ergeben nach Röntgenbestrahlung eine Häufung der Brüche im *Heterochromatin*. In einer Reihe weiterer Arbeiten werden die *insertionsnahen Chromosomenregionen* als besonders bruchempfindlich erkannt. Nach Röntgenbestrahlung: PATTERSON (1934, *Drosophila*), KRAJEVOI und RASSULY (1935, *Pisum*), SAX und MATHER (1939, *Tradescantia*), SAX (1940, *Tradescantia*), GILES (1940, *Tradescantia*), MARQUARDT (1942, Translokationen bei *Bellevalia*), DA CAMARA, WAGNER, GARDÉ (1949, *Triticum*) und DEUFEL (1951, M-Chromosomen von *Vicia faba*). Den gleichen Befund gibt

und sichtbarer Wirkung eine relativ lange Zwischenzeit. Über die auf

STRAUB (1941) nach UV-Bestrahlung für *Gasteria* an. Schließlich finden einige Autoren eine deutliche Brucherrhöhung direkt in der *Insertionsstelle*: KOLLER (1946, *Tradescantia*, Röntgenstrahlen), DARLINGTON und KOLLER (1947, *Tradescantia*, Senfgas) und AUERBACH (1946, 1947a, *Drosophila*, Senfgas).

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich, daß eine generelle Beantwortung dieser Frage nicht möglich ist, sondern daß an nahezu jedem Objekt andere Ergebnisse erzielt wurden. Es ist in diesen Arbeiten praktisch jede Chromosomenregion vertreten, in der Brüche bevorzugt auftreten können. Die zu prüfende Annahme, nämlich die gleichmäßige Verteilung der Brüche über das Chromosom, ist am seltensten realisiert. Daraus ergibt sich, daß für den größten Teil der bisher behandelten Objekte das Chromosom nicht als Einheit auf eine Schädigung reagiert, sondern daß verschiedene Regionen des Chromosoms eine verschiedene Resistenz gegenüber dem schädigenden Einfluß eines mutagenen Agens aufweisen. Diese verschiedenartige Bruchverteilung hat zu einer Reihe von Theorien geführt, in denen Unterschiede in der Verteilung der Nukleinsäure (DARLINGTON und KOLLER 1947), der Spiralisierungsspannung (SAX und MATHER 1939), der physiologischen Aktivität (DA CAMARA 1949) u. a. als Ursachen für die Häufung von Brüchen in bestimmten Chromosomenregionen angeführt werden. Die meisten dieser Hypothesen lassen sich nur auf den vom betreffenden Autor untersuchten Spezialfall anwenden und besitzen für die Befunde anderer Autoren an anderen Objekten keine Gültigkeit.

Die Untersuchungen an *Solanum lycopersicum* ergeben eine hohe Bruchempfindlichkeit der Insertionsstelle. Der Vergleich zwischen Hetero- und Euchromatin ergibt außerdem eine stärkere Bruchbeteiligung des Heterochromatins. Diese Befunde stimmen bis zu einem gewissen Grade mit den Ergebnissen der Röntgenversuche KOLLERS (1946) an *Tradescantia* und der Senfgasversuche DARLINGTONS und KOLLERS (1947) ebenfalls an Mitosis und Meiosis von *Tradescantia* überein. Dort treten als *Primäreffekte* unmittelbar vor der Metaphase und in der Anaphase ausschließlich Zentromerschädigungen auf. Diese äußern sich zunächst in einer Dehnung der Insertionsstelle, die schließlich zum Bruch führt, ein Vorgang, der an den hier untersuchten Pachytänchromosomen nicht beobachtet werden konnte. DARLINGTON macht für die Bruchempfindlichkeit der Insertionsstelle in erster Linie die unterschiedliche Verteilung der Nukleinsäure am Metaphasechromosom verantwortlich. Im Verlaufe der Prophase lagert das Chromosom Nukleinsäure an. Die Anlagerung erreicht in der Metaphase ihr Maximum und stellt einen Schutz des Chromosoms gegenüber der schädigenden Einwirkung der Strahlen bzw. Chemikalien dar, der sich aber nur auf die Chromosomenschenkel, nicht auf die Insertionsstelle auswirkt, an der ja

keine Anlagerung von Nukleinsäure erfolgt ist. Daß die Zentromerbrüche zeitlich mit der Einordnung der Chromosomen in die Äquatorialplatte zusammenfallen, bringen DARLINGTON und KOLLER mit der physiologischen Aktivität der Insertionsstelle im Hinblick auf die Spindelbildung in Zusammenhang. Bei der Einwirkung von Senfgas auf den Ruhekern und die meiotische Prophase finden sie diese Zentromerbrüche nicht, sondern es treten „fibre-breakages“ auf, die den Chromosomenfaden zerschlagen, der in diesem Stadium bei einem euchromatischen Objekt gestreckt und nicht durch eine Nukleinsäureauflagerung geschützt ist.

Die Übertragung dieser Hypothese von DARLINGTON und KOLLER auf die Befunde an *Solanum lycopersicum* bietet einige Schwierigkeiten. Die physiologische Aktivität der Insertionsstelle kann für die Zentromerbrüche nicht herangezogen werden, denn die Brüche wurden im Ruhekern und in der meiotischen Prophase induziert, und gerade in diesen Stadien fanden DARLINGTON und KOLLER bei ihren euchromatischen Objekten keine Zentromerbrüche. Bei den partiell heterochromatischen Chromosomen von *Solanum lycopersicum* zeigt jedes der 3 Strukturelemente dieser Chromosomen, nämlich Insertionsstelle, Heterochromatin und Euchromatin, eine andere Resistenz gegenüber der schädigenden Einwirkung der Röntgenstrahlen. Soweit es sich um den Vergleich der Bruchempfindlichkeit von *Heterochromatin und Insertionsstelle* handelt, kann die DARLINGTONSche Hypothese bedingt angewendet werden. Der heterochromatische Teil eines Pachytänchromosoms hat bereits eine starke Auflagerung von Nukleinsäure erfahren, die sich besonders an den sehr dicht gelagerten Makrochromomeren findet. Auch im prämeiotischen Ruhekern liegt das Heterochromatin in Form der Chromozentren vor, d. h. maximal spiralisierte, nukleinsäurereiche Chromosomenteile. Es ist dadurch erklärlich, daß schädigende Einflüsse, die auf die heterochromatische Region eines derartigen Chromosoms einwirken, zunächst die wesentlich ungeschütztere und labiler erscheinende Insertionsstelle zerschlagen und die resistenteren heterochromatischen Partien nicht so stark zu schädigen vermögen. Daraus resultiert der hohe Prozentsatz von Zentromerschädigungen auch im prämeiotischen Ruhekern und im Pachytän partiell heterochromatischer Chromosomen.

In der Übertragung der DARLINGTONSchen Hypothese auf die Verhältnisse in partiell heterochromatischen Chromosomen wurde somit eine Möglichkeit gefunden, die höhere Bruchempfindlichkeit der Insertionsstelle gegenüber dem Heterochromatin zu deuten. Diese Hypothese erklärt jedoch noch nicht die höhere Bruchbeteiligung des *Heterochromatins gegenüber dem Euchromatin*. Bei der großen Chromosomenzahl von *Solanum lycopersicum* konnten die Euchromatinbrüche in den oft sehr unübersichtlichen Pachytänkernen nicht statistisch erfaßt werden, aber — wie die Untersuchungen am Satellitenchromosom beweisen —

ist im Euchromatin eine geringere Häufigkeit als im Heterochromatin ohne Zweifel vorhanden. Sie wurde außerdem von BAUER (1939) und von PROKOFEWA-BELGOVSKAJA (1939) an *Drosophila* nachgewiesen.

Die weitgehend entspiralisierten euchromatischen Enden entbehren, vor allem im prämeiotischen Ruhekern, jeden Schutzes. Sie müßten eigentlich gerade bei partiell heterochromatischen Chromosomen ganz besonders bruchempfindlich sein, zeigen aber in den Röntgenversuchen eine auffallende Resistenz. Eine Erklärung hierfür wäre gefunden, wenn Verschiedenheiten im chemischen Aufbau des im wesentlichen proteinhaltigen Grundgerüsts des Chromosoms die verschiedenartige Resistenz bestimmter Chromosomenteile bedingen. Im chemischen Aufbau des Chromatins besteht nach CASPERSSON (1940) zwischen Eu- und Heterochromatin insofern ein Unterschied, als das *Euchromatin* aus höheren Eiweißen vom Globulintypus aufgebaut ist, während das *Heterochromatin* in der Hauptsache *niedere* Eiweiße vom Histontypus enthält. Das Chromonema besteht aus einer Kette aneinandergereihter Eiweißmoleküle. In dieser Kette sind die chemischen oder physikalischen Bindungen zwischen den einzelnen Molekülen Orte erhöhter Labilität und stellen nach einer Vorstellung KAPLANS (1940) bevorzugte Angriffspunkte für die schädigende Wirkung mutagener Agenzien dar. Wenn nun das Heterochromatin, wie CASPERSSON nachgewiesen hat, aus niederen Eiweißen mit kürzerer Kettenlänge zusammengesetzt ist, so bedeutet das, daß infolge der Aufeinanderfolge einer größeren Anzahl kürzerer Proteinmoleküle im Heterochromatin mehr Angriffspunkte für die bruchauflösende Wirkung vorhanden sind. Das Euchromatin hingegen besteht aus höheren Eiweißen mit längeren Ketten, es werden also in einer euchromatischen Region von vornherein weniger Angriffspunkte als im Heterochromatin vorhanden sein. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Bruch eintreten kann, wird also niedriger sein als im Heterochromatin.

Für die höhere Bruchempfindlichkeit der Insertionsstelle gegenüber dem Euchromatin könnten ebenfalls chemische Unterschiede verantwortlich sein, denn die von DARLINGTON angeführte physiologische Aktivität der Insertionsstelle kann für die im Ruhekern bzw. im Pachytän induzierten Brüche nicht geltend gemacht werden, weil in diesem Stadium die Insertionsstellen praktisch noch funktionslos sind. Da über den chemischen Aufbau der Insertionsstelle noch nichts bekannt ist, bleibt diese Annahme vorläufig hypothetisch.

IV. Die Entstehung spontaner Mutationen.

Die Untersuchungen an *Solanum lycopersicum* ergaben eine hohe Bruchempfindlichkeit der Insertionsstellen. Bei reziproken Translokationen werden daher bevorzugt beide an der Translokation beteiligten Chromosomen in der Insertionsstelle gebrochen sein, das führt nach

der Restitution im Pachytän dazu, daß der Translokationspunkt mit den Insertionsstellen der 4 beteiligten Chromosomen zusammenfällt. Da nach den Untersuchungen von MARQUARDT (1941) die in der Meiosis entstandenen Umbauten nur zum Teil zu lebensfähigen Nachkommen führen, erhält die Frage, ob 2 translozierte Chromosomen, die infolge eines Bruches ihrer Insertionsstellen zustande kommen, in vollem Maße funktionsfähig sind, ein besonderes Interesse.

Nach SHARP (1934) und NEBEL (1939) besteht die Insertionsstelle aus einer achromatischen Region, in deren Mitte 2 stärker färbare Körperchen, die „kinetic bodies“ liegen. Diese Körperchen stehen während der Anaphasenwanderung der Chromosomen mit der Spindel in Verbindung. Es fragt sich nun, ob ein transloziertes Chromosom nur dann voll funktionsfähig ist, wenn Bruch und Rekombination in der Weise erfolgt sind, daß das umgebaute Chromosom wieder 2 „kinetic bodies“ enthält, oder ob die achromatische Region, die im ganzen als Insertionsstelle bezeichnet wird, ausreicht, um dem Chromosom seine normale Bewegungsfähigkeit zu geben. Diese „kinetic bodies“ sind nicht bei allen Objekten färberisch nachzuweisen, was nicht unbedingt beweist, daß sie bei diesen Objekten nicht vorhanden sind. Eingehende Untersuchungen hierüber liegen von RHOADES (1940) vor, der die „kinetic bodies“ an Maischromosomen in keinem mitotischen und meiotischen Stadium beobachten konnte. Er nimmt deshalb an, daß beim Mais keine Differenzierung der Zentromerregion in wahrnehmbaren Strukturen vorhanden ist, denen eine spezifische funktionelle Bedeutung zukommen könnte. Gestützt wird diese Annahme durch Befunde von McCLINTOCK (1938), aus denen hervorgeht, daß beide Teile eines durchgeschlagenen Zentromers in normaler Weise funktionierten. Schließlich sind in diesem Zusammenhang noch die Untersuchungen ÖSTERGRENs (1949) an *Luzula purpurea* zu erwähnen. Die Chromosomen dieses Objekts besitzen keine morphologisch und physiologisch besonders ausgeprägte Zentromerregion, die Funktion der Insertionsstelle ist vielmehr über die gesamte Länge des Chromosoms verteilt, es ist ein „diffuses Zentromer“ vorhanden. Nach Röntgenbestrahlung zeigen sogar Fragmente das gleiche normale Anaphaseverhalten wie ganze Chromosomen. Auch aus einem anderen Grunde sind Translokationen, deren Translokationspunkt in der Insertionsstelle oder im Heterochromatin liegt, erhaltungsfähiger als solche, deren Translokationspunkt mitten im Chromosomenschenkel liegt. Durch die Chiasmenbildung resultieren im letzteren Falle Verteilungsstörungen in der Anaphase durch das Auftreten von Mehrfachbindungen (OEHLKERS, LINNERT 1949, MARQUARDT 1942). Auf Grund dieser Befunde ist es wahrscheinlich, daß die in den Insertionsstellen translozierten Chromosomen voll funktionsfähig bleiben.

DARLINGTON und KOLLER (1947) weisen im Zusammenhang mit der hohen Bruchempfindlichkeit der Insertionsstellen von *Tradescantia*-Chromosomen darauf hin, daß diese Befunde die ersten experimentellen Analogien herstellen zu spontan abgelaufenen Brüchen, die man bei *Tradescantia* und *Tulipa* festgestellt hat. Aus Untersuchungen von JAPHA (1939) am Viererring von *Oenothera* (*Hookeri* \times *Lamarckiana*) im Diplotän ergibt sich mit großer Wahrscheinlichkeit, daß der Translokationspunkt des in diesem Bastard vorhandenen Viererrings weit im Heterochromatin liegen muß, das bedeutet aber in der Insertionsstelle oder doch in unmittelbarer Nähe davon. Somit wäre auch bei *Oenothera* — einem partiell heterochromatischen Objekt — durchaus die Möglichkeit gegeben, daß den in dieser Gattung spontan abgelaufenen Chromosomenmutationen die gleichen Vorgänge zugrunde liegen, wie sie an *Solanum lycopersicum* durch die Wirkung der Röntgenstrahlen hervorgerufen worden sind.

Zusammenfassung.

1. Das Pachytän von *Solanum lycopersicum* wird analysiert; es sind alle Chromosomen des Genoms identifizierbar.
2. Die einzelnen Strukturmerkmale der Pachytänchromosomen werden einer Untersuchung in bezug auf ihre Zuverlässigkeit für die Identifizierung von Pachytänchromosomen unterzogen. Dabei ergibt sich, daß Länge, Symmetrieverhältnisse und Zahl der Makrochromomeren zum Teil erheblich variieren und die Identifizierung eines Einzelchromosoms sehr erschweren können. Es wird dabei offen gelassen, ob diese Variabilität ihre Ursache in Verzerrungen der Chromosomen beim Anfertigen des Quetschpräparates hat oder ob sie in vivo vorhanden ist. Untersuchungen an den kleinsten Chromosomen des Genoms sprechen jedoch für die letztere Annahme. Das würde bedeuten, daß die Spiralisierung der Chromosomen in den frühen meiotischen Stadien nicht zentral gesteuert wird, sondern daß den Chromosomen in der Geschwindigkeit des Spiralisationsvorgangs eine gewisse Selbständigkeit zukommt.
3. Es wird die Frage der Polyploidie des Objekts an Hand der Pachytänanalyse geprüft. Auf Grund einer Reihe struktureller Übereinstimmungen zwischen 4 Chromosomenpaaren des Genoms ist es von einer zytologischen Betrachtungsweise aus möglich, daß *Solanum lycopersicum* eine tetraploide Form mit der Grundzahl 6 ist.
4. Durch Einwirkung von Röntgenstrahlen wurden Chromosomenmutationen ausgelöst und ihre Pachytänkonfigurationen analysiert. Dabei ergab sich, daß sich alle Umbauten sowohl durch Bestrahlung des prämeiotischen Ruhekerns als auch des Pachytäns induzieren lassen, es bestehen lediglich quantitative Unterschiede zwischen der Wirkungsweise der Röntgenstrahlen auf diese beiden meiotischen Stadien.

5. Außer den bekannten Aberrationen wurden als neuer Typus dreischenklig Konfigurationen gefunden und ihr Zustandekommen gedeutet. Das gleiche gilt für eine Reihe komplizierterer Konfigurationen, an deren Zustandekommen mehr als 2 Chromosomen und eine größere Zahl von Brüchen beteiligt sind.

6. Bei der Untersuchung der Lage der Bruchstellen auf den Chromosomen ergibt sich eine hohe Bruchempfindlichkeit der Insertionsstelle gegenüber der Einwirkung von Röntgenstrahlen. Der Vergleich der Bruchverteilung zwischen Hetero- und Euchromatin ergibt eine größere Beteiligung des Heterochromatins. Für die unterschiedliche Verteilung der Brüche im Chromosom wird in Anlehnung an eine DARLINGTONSche Hypothese der Versuch einer Deutung der Verhältnisse bei *Solanum lycopersicum* gemacht. Darüber hinaus werden die im Verlauf der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse auf den Ablauf spontaner Chromosomenmutationen übertragen.

Herrn Prof. Dr. OEHLKERS danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit. In gleicher Weise danke ich Fräulein Dr. LINNERT für die Unterstützung, die sie mir während meiner Arbeit gewährt hat.

Literatur.

- AUERBACH, CH.: Chemical mutagenesis. Biol. Rev. Cambridge philos. Soc. **24**, 355 (1949). — BAUER, H.: Röntgenauslösung von Chromosomen-Mutationen bei *Drosophila melanogaster*. Chromosoma **1**, 343 (1939). — BLEIER, H.: Zytologische Untersuchungen an Kartoffeln. Züchter **5**, 225 (1933). — BROWN, S. W.: The structure and meiotic behavior of the differentiated chromosomes of tomato. Genetics **34**, 437 (1949). — DA CAMARA, WAGNER u. GARDÉ: Location of breakes induced by X-rays in chromosomes of Triticum. Hereditas (Lund.) **1949**, 570. — CASPERSSON: Über Eiweißstoffe im Chromosomengerüst. Naturwiss. **28**, 514 (1940). — DARLINGTON and KOLLER: The chemical breakage of chromosomes. Hereditas **1**, 187 (1947). — DARLINGTON, C. D.: Nucleic acid and the chromosomes. Symp. Soc. exper. Biol. **1**, 252 (1947). — DEUFEL, J.: Untersuchungen über den Einfluß von Chemikalien und Röntgenstrahlen auf die Mitose von *Vicia faba*. Chromosoma **4**, 239 (1951). — ERNST, H.: Meiosis and crossing-over. Z. Bot. **33**, 241 (1938). — FORD: Chromosome-breakage in nitrogen mustard treated *Vicia faba* root tip cells. Hereditas (Lund.) **1939**, 570. — GEITLER, H.: Neue Ergebnisse auf dem Gebiet des Chromosomenbaus. Naturwiss. **28**, 649 (1940). — Schnellmethoden der Kern- und Chromosomen-Untersuchung. Berlin 1942. — JAPHA, B.: Die Meiosis von *Oenothera*. II. Z. Bot. **34**, 321 (1939). — KAPLAN, R.: Zur Frage der physikochemischen Struktur des Chromosoms. Naturwiss. **28**, 79 (1940). — KOLLER, P. CH.: The experimental modification of nucleic acid systems in the cell. Symp. Soc. exper. Biol. **1**, 270 (1947a). — KUWADA, Y.: Chromosome structure. Cytologia **10**, 213 (1939). — LEWITZKY i SIZOVA: Further studies on regularities in chromosome transformations in *Crepis capillaris* induced by X-rays. C. r. Acad. Sci. URSS. **4**, 71 (1935). — LINNERT, G.: Die Bestimmung des Zeitpunktes für das Auftreten von Chromosomenmutationen in der Meiosis von *Oenothera* nach experimenteller Einwirkung. Z. Abstammungslehre **88**, 414 (1950a). — Die Einwirkung von Chemikalien auf die Meiosis. Z. Abstammungslehre **88**, 422 (1950b). —

- MARQUARDT, H.: Die Meiosis von *Oenothera*. Z. Zellforschg 27, 159 (1937). — Die Röntgenpathologie der Mitose. I. u. II. Z. Bot. 32, 401 (1938). — Über Bau, Häufigkeit und Auswirkung der spontanen Translokationen. Flora (Jena) 35, 239 (1941). — Die Röntgenpathologie der Mitose. III. Z. Bot. 36, 273 (1941). — Die Verteilung röntgeninduzierter Veränderungen auf den Chromosomen von *Bellevalia romana*. Ber. dtsh. bot. Ges. 1942, 98. — Die Schädigung des Zellkerns durch Röntgenbestrahlung. Experientia 5, 31 (1949). — Quantitative Auswertung eines Versuchs zur Auslösung von Chromosomen-Mutationen durch ein Äthylurethan-KCl-Gemisch. Experientia 5, 443 (1949). — McCINTOCK, B.: The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea Mays*. Z. Zellforschg 19, 191 (1933). — The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. Genetics 23, 5 (1938). — NAITTHANI: Chromosome studies in *Hyacinthus orientalis*. Ann. of Bot. 1 (1937). Zit. nach STRAUB 1938. — OEHLKERS, F.: Die Auslösung von Chromosomen-Mutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. Z. Abstammungslehre 81, 313 (1943). — Weitere Versuche zur Mutationsauslösung durch Chemikalien. Biol. Zbl. 65, 176 (1946). — Mutationsauslösung durch Chemikalien. Sitzgs-ber. Heidelbg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl. 1949. — OEHLKERS, F., u. LINNERT: Neue Versuche über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. Z. Abstammungslehre 83, 136 (1949). — ÖSTERGREN, G.: *Luzula* and the mechanism of chromosome movements. Hereditas (Lund.) 35, 445 (1949). — OHLENDORF, A.: Untersuchungen zur Zytologie und Physiologie der Meiosis an *Solanum lycopersicum* und *Solanum tuberosum*. Diss. Freiburg i. Br. 1944. — PATTERSON and STONE: The production of translocations in *Drosophila*. Amer. Naturalist 68, 359 (1934). Zit. nach BAUER 1939. — PROPACH, H.: Zytogenetische Untersuchungen in der Gattung *Solanum*. I. Z. Abstammungslehre 72, 555 (1937). — Zytogenetische Untersuchungen in der Gattung *Solanum*. V. Z. Abstammungslehre 78, 115 (1940). — RHOADES, M.: Studies of a telocentric chromosome in Maize with reference to the stability of its centromere. Genetics 25, 483 (1940). — SAX, K.: X-ray-induced aberrations. Genetics 23, 491 (1938). — An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. Genetics 25, 41 (1940). — SAX, K., and MATHER: An X-ray analysis of progressive chromosome spitting. J. Genet. 37, 483 (1939). — SHARP, L. W.: Introduction to cytology, S. 116. 1934. — STRAUB, J.: Die Spiralstruktur der Chromosomen. Z. Bot. 33, 65 (1938). — Chromosomenmutationen nach UV-Bestrahlung. Naturwiss. 29, 13 (1941). — VOGT, M.: Mutationsauslösung bei *Drosophila* durch Äthylurethan. Experientia 4, 68 (1948).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
**DER VERGLEICH VON RÖNTGEN-
UND CHEMISCH INDUZIERTEN CHROMOSOMENMUTATIONEN
IM PACHYTÄN VON SOLANUM LYCOPERSICUM.**

Von
WERNER GOTTSCHALK.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. März 1951.)

Inhalt.	Seite
A. Einleitung	342
B. Material und Methode	343
C. Experimenteller Teil.	343
1. Vergleich der Chemikalien- und Röntgenwirkung auf das Pachytän von <i>Solanum lycopersicum</i>	343
a) Anzahl und Art der aufgefundenen Chromosomenmutationen. . .	344
b) Bruchverteilung	346
c) Die Häufigkeit der Aberrationen in den behandelten Antheren. .	349
2. Die Einwirkung von Chemikalien auf die späteren meiotischen Stadien	351
D. Theoretischer Teil.	351
1. Die Bruchverteilung auf die verschiedenen Regionen partiell hetero- chromatischer Chromosomen nach Chemikalieneinwirkung	352
2. Der Vergleich von Chemikalien- und Röntgenwirkung auf partiell heterochromatische Chromosomen.	354
Zusammenfassung	357
Literatur	357

A. Einleitung.

Die experimentelle Auslösung von Chromosomenmutationen hat im letzten Jahrzehnt, ausgehend von der klassischen Röntgenmethode, eine beträchtliche Erweiterung erfahren. Ultrakurzwellen, ultraviolette Strahlen, Temperaturschocks, vor allem aber eine größere Anzahl von Chemikalien haben sich als mutagen erwiesen. Ihre Wirksamkeit entspricht dabei in manchen Fällen der Wirkung einer kräftigen Röntgendosis oder übersteigt sie sogar. Der Vergleich der Effekte, die durch die Anwendung der verschiedenartigen physikalischen und chemischen Agenzien erzielt werden, erbringt, wie zahlreiche Arbeiten gezeigt haben, eine weitgehende qualitative Übereinstimmung der cytologischen Befunde. Um aber zu einer empirischen Basis zu gelangen, von der aus sich etwas über die Frage nach dem Ablauf der Vorgänge aussagen läßt, die ihrerseits zu den Chromosomenumbauten führen, ist es dringend erforderlich, auch die quantitativen Befunde zu erweitern.

Nachdem wir in einer früheren Arbeit (GOTTSCHALK 1951) die Wirkung der Röntgenstrahlen auf prämeiotische Ruhekerne und auf das

Pachytän von *Solanum lycopersicum* untersucht haben, sind nunmehr in der vorliegenden Arbeit analoge Versuche mit Chemikalien durchgeführt worden. Als Test für den Eingriff der Chemikalien wurde, wie in den Röntgenversuchen, neben der Anzahl und Art der aufgefundenen Aberrationen vor allem die Verteilung der Bruchstellen auf die drei Längselemente der betroffenen Chromosomen — Insertionsstelle (= Kinetochor), Hetero- und Euchromatin — verwendet. Damit ist ein exakter Vergleich der Röntgen- und Chemikalienwirkung möglich.

B. Material und Methode.

Als Versuchspflanzen dienten die Handelssorten „Sieger“ und „Rheinlands Ruhm“ von *Solanum lycopersicum*. Als Chemikalien wurden einige von OEHLEKERS (1943) als stark mutagen erkannte Substanzen verwendet, in der Hauptsache ein Gemisch von m/20 Äthylurethan in Kombination mit m/200 KCl, daneben noch AlCl_3 in Konzentrationen von $\frac{1}{50}$ und $\frac{1}{1000}$ Mol. Die Infloreszenzen wurden in 40 cm Länge abgeschnitten, 12 bzw. 24 Std in die mutagene Substanzlösung gestellt und danach in fließendes Wasser umgesetzt. In den Hauptversuchen wurden die Antheren 72 Std nach Versuchsbeginn in Carnoy 3:1 fixiert. Nach OEHLENDORF (1944) dauert der Ablauf der Meiosis bei *Solanum lycopersicum* vom frühen Leptotän bis zum Pachytän etwa 2 Tage. Die 3 Tage nach Versuchsbeginn fixierten Pachytänkern befanden sich — unter der Voraussetzung, daß die Entwicklung in den Antheren der abgeschnittenen Infloreszenzen etwa normal weiterläuft — demnach zum Zeitpunkt der Substanzwirkung im Stadium prämeiotischer Ruhekerne. Die Färbemethode wurde gegenüber den vorjährigen Versuchen (GOTTSCHALK 1951) etwas modifiziert: Es wurde wiederum das von GEITLER (1942) angegebene starke Eisessig-Karmingemisch verwendet, jedoch mit einem stärkeren Eisenzusatz (1 cm³ FeCl_3 auf 100 cm³ Eisessig-Karmin). Die Antheren wurden vor dem Färben isoliert und angeschnitten. Auf diese Weise erreicht man nach 8–10 Std eine kontrastreiche Färbung, die auch eine exakte Untersuchung des Euchromatins der Pachytänchromosomen gestattet.

Optik: Winkel-Zeiß Standardmikroskop; Ölimmersion 100fach; Okulare 8 und 12,5fach; großes mikrophotographisches Stativ von Zeiß.

C. Experimenteller Teil.

1. Vergleich der Chemikalien- und Röntgenwirkung auf das Pachytän von *Solanum lycopersicum*.

Wie sich in früheren Untersuchungen zeigen ließ, ist das Pachytän von *Solanum lycopersicum* vollständig analysierbar (GOTTSCHALK 1951). Die 12 partiell heterochromatischen Chromosomen des Genoms lassen sich an Hand der Lage und Struktur des Heterochromatins, der Lage der Insertionsstelle und der Länge der euchromatischen Enden identifizieren. Nach der Einwirkung mutagener Agenzien auf frühe meiotische Stadien treten im Pachytän Chromosomenmutationen in Form abweichender Konfigurationen auf, die bei genauer Kenntnis der Pachytänchromosomen eine Lokalisation der entstandenen Bruchstellen der Chromosomen ermöglichen. Auf diese Weise gelang es, von den nach

Tabelle 1. Übersicht über die in den Röntgen- und Chemikalienversuchen aufgefundenen Pachytinkonfigurationen sowie über die Lage der Bruchstellen in den Chromosomen von *Solanum lycopersicum*.

Mutagenes Agens	Gesamtzahl der Chromosomenmutationen	Davon entfallen auf				Gesamtzahl der lokalisierten Bruchstellen	Lage der Bruchstellen im Chromosom		
		Kreuzkonjugationen	3-Bruch-Resstitutionen	Deletionen	Inversionen		Insertion	Heterochromatin	Euchromatin
Röntgenstrahlen	346	308 (89,0%)	17 (4,9%)	14 (4,0%)	2 (0,6%)	697	510 (73,2%)	128 (18,4%)	59 (8,4%)
Chemikalien 1950	716	665 (92,9%)	29 (4,0%)	4 (0,6%)	13 (1,8%)	1463	1177 (80,4%)	117 (8,0%)	169 (11,6%)
Erwartungswerte für Hetero- und Euchromatin bei gleichmäßiger Bruchverteilung (ohne Berücksichtigung der Insertionsstelle)							—	101	185

Röntgenbestrahlung aufgetretenen Aberrationen insgesamt 346 Konfigurationen zu analysieren und die Lage von 697 Bruchstellen zu ermitteln (GOTTSCHALK 1951). Es ergab sich dabei, daß die Lage der Bruchstellen nicht der erwarteten zufallsgemäßen Verteilung entsprach, sondern daß die Insertionsstelle in hohem Maße bruchempfindlicher war als die übrigen Chromosomenregionen (Tabelle 1). Der Vergleich zwischen Hetero- und Euchromatin erbrachte eine höhere Bruchempfindlichkeit des Heterochromatins.

Es war zu prüfen, ob und inwieweit die Wirkung der Chemikalien mit diesen Ergebnissen übereinstimmt. Es ergab sich zunächst, daß sich zwischen der Wirkung des Äthylurethan-KCl-Gemisches und derjenigen des Aluminiumchlorids hinsichtlich der aufgefundenen Konfigurationstypen und der Bruchverteilung keine Unterschiede feststellen ließen, die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen wurden daher zusammengefaßt. Differenzen traten lediglich in der Häufigkeit der Aberrationen, die sich in den analysierbaren Zellen der behandelten Antheren nachweisen ließ, auf; sie werden in einem besonderen Abschnitt behandelt.

a) Anzahl und Art der aufgefundenen Chromosomenmutationen.

Solanum lycopersicum spricht sehr gut auf die verwendeten Chemikalien an. Im Versuchsmaterial wurden insgesamt 716 Aberrationen gefunden, das ist mehr als die doppelte Anzahl der in den vorjährigen

Röntgenversuchen analysierten Konfigurationen (Tabelle 1). An Aberrationstypen fanden sich die gleichen wie nach Röntgeneinwirkung, auch der Anteil der verschiedenartigen Konfigurationen an der Gesamtzahl der aufgefundenen Chromosomenmutationen entspricht etwa den Verhältnissen nach Röntgenbestrahlung. Den weitaus größten Anteil

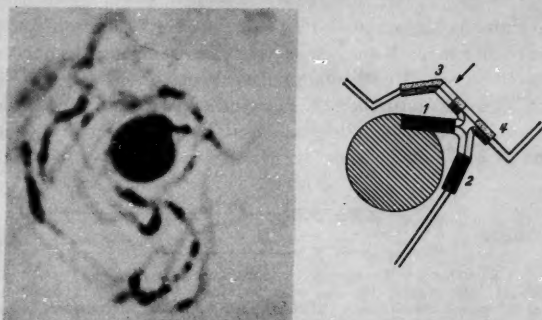


Abb. 1. Kreuzkonjugation, der eine reziproke Translokation zwischen dem Satellitenchromosom (1—2) und dem Chromosom Nr. 5 (3—4) zugrunde liegt. Bruchstelle im Satellitenchromosom in der Insertion, im Chromosom Nr. 5 im Heterochromatin. Die Insertionsstelle des Chromosoms Nr. 5 ist im linken Schenkel deutlich sichtbar (Pfeil). (m/20 Äthylurethan + m/200 KCl, fixiert nach 3 Tagen.)

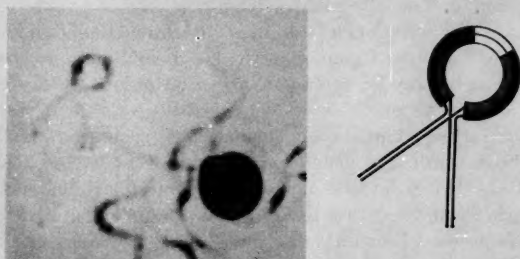


Abb. 2. Inversion im Chromosom Nr. 4. Beide Bruchstellen liegen im Euchromatin des aberrierten Chromosoms. (m/20 Äthylurethan + m/200 KCl, fixiert nach 3 Tagen.)

nehmen wiederum die Kreuzkonjugationen ein (92,9%), es folgen 3-Bruch-Restitutionen, Inversionen und Deletionen (Abb. 1 und 2). Auch einige komplizierte Figuren traten wieder auf, deren Zustandekommen aber gegenüber den entsprechenden röntgeninduzierten Konfigurationen keine neuen Gesichtspunkte erbringt und die deshalb nicht gesondert behandelt werden sollen. Die Übereinstimmung der Wirkung beider Agenzien zeigt sich besonders im Auftreten seltener Aberrationstypen, z. B. der 3-Bruch-Restitutionen. Sie sind — außer bei *Oenothera*

(OEHLKERS 1943) — bisher nur an *Solanum lycopersicum* beobachtet worden und treten hier nach Röntgen- und Chemikalieneinwirkung in der gleichen Größenordnung auf, nämlich mit einem Anteil von 4,9 bzw. 4,0% an der Gesamtzahl der analysierbaren Konfigurationen.

b) Bruchverteilung.

Die Untersuchungen über die Verteilung der Brüche auf das Chromosom wurden zunächst an 2 sehr charakteristischen Chromosomen des Genoms, dem Satellitenchromosom und dem Chromosom Nr. 11, durchgeführt. Die strukturellen Eigenarten dieser beiden Chromosomen heben sie deutlich von allen anderen Chromosomen des Genoms ab, und die exakte Lokalisation der Bruchstellen bereitet — besonders in

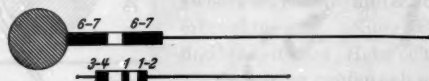


Abb. 3. Die Pachytänchromosomen Nr. 1 (Satellitenchromosom) und Nr. 11 des Genoms von *Solanum lycopersicum*. Das Satellitenchromosom ist durch seine gesetzmäßige Lage zum Nukleolus identifiziert. Das Chromosom Nr. 11 besitzt als einziges Chromosom des Genoms einen dreigeteilten heterochromatischen Mittelteil. Die Zahlen über den heterochromatischen Partien geben die Anzahl der Makrochromomeren an.

dem stark aufgegliederten Chromosom Nr. 11 — keine Schwierigkeiten (Abb. 3).

Unter den in den Chemikalienversuchen insgesamt beobachteten 716 Chromosomenmutationen war das Satellitenchromosom an der Bildung von 49 und das Chromosom Nr. 11 an der Bildung von 44 Konfigurationen beteiligt. Diese Zahlen liegen, gemessen an der Gesamtzahl der aufgefundenen Aberrationen, deshalb unter den theoretisch erwarteten Werten, weil für die folgenden Untersuchungen nur Figuren berücksichtigt wurden, in denen nicht nur die Bruchstellen lokalisiert, sondern die beiden an der Bildung der Konfiguration beteiligten Chromosomen auch identifiziert werden konnten. Von den 49 Brüchen des Satellitenchromosoms liegen 41, das sind 83,7%, in der Insertionsstelle, weitere 8 (16,3%) im Heterochromatin. Im Euchromatin des Satellitenchromosoms konnten keine Brüche nachgewiesen werden. Im Chromosom Nr. 11 ist das Zahlenverhältnis stark zugunsten des Euchromatins mit einem Anteil von 31,8% verschoben, es liegen jedoch noch immer 29 Brüche (65,9%) in der Insertion. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Insertionsstellen der Chromosomen von *Solanum lycopersicum* auch gegenüber der Einwirkung von Chemikalien besonders bruchempfindlich sind.

In der Tabelle 2 ist die Wirkungsweise von Röntgenstrahlen und Chemikalien auf die beiden obengenannten Chromosomen verglichen. Für jedes einzelne der beiden Chromosomen ergibt sich im Hinblick

Tabelle 2. Vergleich der Verteilung röntgen- und chemisch-induzierter Brüche auf Insertionsstelle, Hetero- und Euchromatin der Chromosomen Nr. 1 (Satellitenchromosom) und Nr. 11 von *Solanum lycopersicum*.

Nummer des Chromosoms	Mutagenes Agens		Gesamtzahl der lokalisierten Bruchstellen	Verteilung der Brüche im Chromosom		
				Insertion	Heterochromatin	Euchromatin
I (Satelliten-Chromosom)	Röntgenstrahlen		90	74 (82,2%)	15 (16,7%)	1 (1,1%)
	Chemikalien		49	41 (83,7%)	8 (16,3%)	—
II	Röntgenstrahlen		28	19 (67,8%)	1 (3,6%)	8 (28,6%)
	Chemikalien		44	29 (65,9%)	1 (2,3%)	14 (31,8%)
11	Röntgenstrahlen + Chemikalien (ohne Berücksichtigung der Insertionsstelle)	erwartet (bei gleichmäßiger Bruchverteilung)	24	1	3	20
		gefunden	24	(48)	2	22

auf die Bruchverteilung eine weitgehende Übereinstimmung von Röntgen- und Chemikalienwirkung. Vergleicht man hingegen die beiden Chromosomen miteinander, so treten auffällige Differenzen zutage, die sich jedoch nur auf die Chromosomen, nicht auf die Wirkungsweise der verschiedenen Agenzien beziehen: Nach Röntgen- und Chemikalieneinwirkung sind im Euchromatin des *Satellitenchromosoms* Brüche sehr selten gefunden worden (1 Fall), während das Heterochromatin mit einem Anteil von mehr als 16% an der Gesamtzahl der Brüche beteiligt ist. Im *Chromosom Nr. 11* hingegen ist der Anteil der Brüche im Euchromatin — wiederum nach der Einwirkung beider Agenzien — übereinstimmend sehr groß (etwa 30%), es finden sich aber nur wenige Brüche im Heterochromatin. Die Insertionsstelle zeigt bei beiden Chromosomen eine hohe Empfindlichkeit, die Differenz kann im Hinblick auf den geringen Anteil, den die Insertion an der Gesamtlänge des Chromosoms hat, vernachlässigt werden.

Da die beiden Chromosomen des Genoms in der gleichen Weise auf Röntgenstrahlen und auf die Chemikalien reagiert haben, ist die eben beschriebene Differenz zwischen den Chromosomen Nr. 1 und 11 wohl nicht zufälliger Art. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre folgende: Das sehr lange *Satellitenbivalent* (durchschnittliche Länge im Pachytän etwa 40μ) ist in diesem frühen meiotischen Stadium nur selten über seine gesamte Länge hinweg zu verfolgen, es ist meist mit den anderen Bivalenten des Kerns verknäuelte. In sehr vielen Kernen ist jedoch das dem

Nukleolus benachbarte Heterochromatin der beiden konjugierten Chromosomen mit der Insertionsstelle analysierbar. Es lassen sich also Brüche in dieser Region verhältnismäßig leicht erfassen, während Aberrationen im Euchromatin in den meisten Fällen der Beobachtung entgehen werden. Das Chromosom Nr. 11 hingegen ist mit einer Durchschnittslänge von 25μ sehr viel kürzer und damit besser in allen seinen Regionen zu untersuchen. Brüche im Euchromatin werden also in diesem Chromosom leichter zu erfassen sein als im Satellitenchromosom. Die Differenz zwischen beiden Chromosomen im Anteil des Heterochromatins an der Bruchhäufigkeit könnte ihre Ursache darin haben, daß das Heterochromatin im Satellitenchromosom einen wesentlich höheren Anteil an der Gesamtlänge einnimmt als im Chromosom Nr. 11 (Abb. 3). Die heterochromatischen Partien der beiden Chromosomen verhalten sich in ihrer Länge etwa wie 3 : 1, in einer heterochromatischen Region, die in ihrer Ausdehnung dem Heterochromatin des Satellitenchromosoms entspräche, wäre demnach im Chromosom Nr. 11 eine Bruchbeteiligung von 9—10% zu erwarten. Damit würde die aus der Tabelle 2 ersichtliche Differenz zwischen der Bruchbeteiligung des Heterochromatins der beiden Chromosomen Nr. 1 und 11 stark herabgemindert werden.

Im folgenden sei noch etwas näher auf die Verhältnisse im Chromosom Nr. 11 eingegangen. Den folgenden Berechnungen wurde die Summe der nach Chemikalien- und Röntgenbehandlung im Hetero- und Euchromatin lokalisierten Bruchstellen zugrunde gelegt. Die in der Insertionsstelle aufgetretenen Brüche sollen für diese Überlegungen völlig unberücksichtigt bleiben.

Im Hetero- und Euchromatin des Chromosoms Nr. 11 wurden insgesamt 24 Brüche lokalisiert. Berücksichtigt man das gegenseitige Längenverhältnis der beiden Chromatinsorten und errechnet die Werte, die bei einer gleichmäßigen Bruchverteilung zu erwarten sind, so ergeben sich für die Insertion 1, für das Heterochromatin 3 und für das Euchromatin 20 Brüche. Die tatsächlich gefundenen Werte kommen mit 2 Heterochromatin- und 22 Euchromatinbrüchen den Erwartungswerten sehr nahe. *Läßt man also für die Beurteilung der Bruchbeteiligung der beiden Chromatinsorten die Insertion, deren hohe Bruchempfindlichkeit bei *Solanum lycopersicum* eindeutig erwiesen ist und für die offenbar besondere Gesetzmäßigkeiten gelten, völlig unberücksichtigt, so ergibt sich für Hetero- und Euchromatin eine gleichmäßige Bruchverteilung.*

Die Auswertung des gesamten Genoms hinsichtlich der Bruchverteilung auf die 3 Chromosomenregionen erbringt in den Chemikalienversuchen folgende Ergebnisse (Tabelle 1. rechts): Von insgesamt 1463 Bruchstellen wurden 80,4% in den Insertionsstellen, 8% im Heterochromatin und 11,6% im Euchromatin der aberrierten Chromosomen lokalisiert.

Lassen wir wiederum — wie beim Chromosom Nr. 11 — die Insertion unberücksichtigt, so ist zwar die Übereinstimmung mit den Erwartungswerten für eine gleichmäßige Bruchverteilung nicht so groß wie beim Chromosom Nr. 11, eine statistisch gesicherte Differenz zwischen den erwarteten und den aufgefundenen Werten ist jedoch nicht vorhanden. Damit läßt sich eine grobe Übereinstimmung der Ergebnisse am gesamten Genom mit den wesentlich exakteren Befunden am Chromosom Nr. 11 konstatieren.

Der Vergleich von Chemikalien- und Röntgenwirkung auf das gesamte Genom ergibt zunächst eine Übereinstimmung in der hohen Bruchempfindlichkeit der Insertionsstellen. Bezüglich des Anteils des Hetero- und Euchromatins scheinen jedoch Unterschiede in der Wirksamkeit der beiden Agenzien vorzuliegen. Während die beiden Chromatinsorten auf die Chemikalienbehandlung etwa gleichartig reagieren, zeigt das Heterochromatin nach Röntgenbestrahlung eine wesentlich höhere Bruchbeteiligung als nach der Einwirkung der Chemikalien. Die Differenz ist mit einem $P_{\text{hom}} < 0,01$ statistisch gesichert. Es muß jedoch beim Vergleich der Bruchempfindlichkeit der beiden Chromatinsorten darauf hingewiesen werden, daß infolge der geringen Färbbarkeit des Euchromatins und der hohen Chromosomenzahl des Objektes eine exakte quantitative Erfassung aller vorhandenen Brüche nicht möglich und damit eine gewisse Vernachlässigung der euchromatischen Chromosomenregionen unvermeidlich ist. Außerdem stehen die auf eine wesentlich exaktere Weise gewonnenen Befunde am Chromosom Nr. 11 (Tabelle 2) im Gegensatz zu diesen Ergebnissen. An Hand der vorliegenden Arbeit läßt sich somit nur ein Hinweis auf die Möglichkeit einer verschiedenartigen Resistenz der beiden Chromatinsorten gegenüber der Röntgen- und Chemikalienwirkung geben. Der Befund bedarf einer Bestätigung an einem weiteren Objekt mit distinkten heterochromatischen Abschnitten bei geringerer Chromosomenzahl.

c) Die Häufigkeit der Aberrationen in den behandelten Antheren.

Um die Wirksamkeit der verschiedenen zur Anwendung gebrachten Chemikalien einerseits und mehrerer Konzentrationen der gleichen Substanz andererseits vergleichen zu können, wurde in behandelten Antheren der prozentuale Anteil der Pollenmutterzellen ermittelt, in denen sich Chromosomenmutationen feststellen lassen. Diese Untersuchungen werden durch die hohe Chromosomenzahl des Objektes sehr erschwert, deren Folge eine Unübersichtlichkeit der Pachytänkerne ist. Nur in wenigen Zellen sind alle 12 Bivalente des Kerns so übersichtlich gelagert, daß sich eine zuverlässige Aussage darüber abgeben läßt, ob der betreffende Kern eine Aberration enthält oder nicht.

Nach der Verwendung des Äthylurethan-KCl-Gemisches wurden bei einer Fixierungszeit von 3 Tagen nach Versuchsbeginn in 14% aller ausgezählten PMZ eine Chromosomenmutation je Kern nachgewiesen (Tabelle 3). In den AlCl_3 -Versuchen wurden verschiedene Konzentrationen zur Anwendung gebracht, um die für *Solanum lycopersicum* wirksamste Konzentration zu ermitteln. Nach der Einwirkung von m/50 AlCl_3 wurden in 37% aller PMZ eine, in weiteren 4% zwei Chromosomenmutationen je Kern gefunden. Nach Verwendung von m/1000 AlCl_3 sank der Prozentsatz aberrierter Zellen auf 6,4% ab. Da wir in der

Tabelle 3. Quantitative Auswertung der Chemikalienversuche an *Solanum lycopersicum*.

Agens	Fixierungszeit Std	Anzahl der aus- gezählten Pollen- mutter- zellen	Prozentsatz der Pachytänkerne		
			ohne Chromo- somen- mu- tationen	mit 1 Chromo- somen- mu- tation	mit 2 Chromo- somen- mu- tationen
			%	%	%
m/20 Äthylurethan + m/200KCl	72	200	85,5	14,0	0,5
m/20 Äthylurethan + m/200KCl	48	200	87,0	12,5	0,5
m/50 AlCl_3	72	200	59,0	37,0	4,0
m/1000 AlCl_3	72	125	93,6	6,4	—
Leitungswasser-Kontrolle . . .	72	116	94,8	5,2	—

Leitungswasserkontrolle eine Mutationsrate von 5,2% fanden, muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß die nach Einwirkung von m/1000 AlCl_3 vorgefundenen Chromosomenmutationen nicht durch das Aluminiumchlorid, sondern durch den beim Abschneiden erlittenen Schock oder den darauffolgenden Nährsalzmangel induziert worden sind. Die relativ hohe Mutationsrate in abgeschnittenen Kontrollpflanzen wurde bereits von STANGE (1951) und von OEHLKERS und LINNERT (1951) an *Oenothera* nachgewiesen.

Wenn auch die vorjährigen Röntgenversuche nicht in dieser Weise ausgewertet wurden, so läßt sich doch aus der Zahl der je Anthere aufgefundenen Chromosomenmutationen ein grober quantitativer Vergleich zwischen Röntgen- und Chemikalienwirkung ziehen. Während die Zahl der Aberrationen in einer röntgenbestrahlten Anthere in der Größenordnung von etwa 5 bis maximal 20 lag, wurden in den chemisch behandelten Antheren 10—60, in einem Fall sogar 121 Chromosomenumbauten je Anthere nachgewiesen. Die Wirksamkeit der verwendeten Chemikalien, vor allem des AlCl_3 in hoher Konzentration, übertrifft also bei *Solanum lycopersicum* die Wirksamkeit einer Röntgendosis von 500 r um das Mehrfache.

2. Die Einwirkung von Chemikalien auf die späteren meiotischen Stadien von *Solanum lycopersicum*.

Fixiert man spätere meiotische Entwicklungsstadien, so finden sich die gleichen Einwirkungen wie nach Röntgenbestrahlung, im wesentlichen also Verklebungen und ihre Folgen. Bei Versuchen, in denen wir ein Äthylurethan-KCl-Gemisch 5 Tage lang in der Kältekammer des Instituts auf die Versuchspflanzen einwirken ließen, traten darüber hinaus noch merkwürdige Abweichungen in der Spindelbildung auf. Zunächst fanden sich sehr kleine, breit ausgebildete Spindeln mit normalem Anaphaseverhalten der Chromosomen.

Es traten jedoch auch sehr schmale, extrem in die Länge gestreckte Spindeln auf (Abb. 4). Sie waren länger als der Zelldurchmesser und lagen gekrümmt der Zellwand an. Im Extremfall lagen die beiden Spindelpole unmittelbar nebeneinander im Zellraum. Die Chromosomen wandern in diesen Spindeln niemals gleichzeitig an die Pole, sondern treten ihre Polwanderung ungleichzeitig aus der Äquatorialebene heraus an, sie sind in der 1. Anaphase über die gesamte Spindel verteilt. Die Folgen dieser abnormalen Spindelbildung traten in anderen PMZ in Erscheinung: In einigen Zellen, die das Stadium der 1. Interphase durchliefen, lagen die beiden Tochterkerne nicht an 2 gegenüberliegenden Polen der PMZ, sondern sie lagen ineinander, so daß eine Trennung der beiden Kerne nicht möglich war. Die extrem verlängerte Spindel und der Phragmoplast lagen nicht zwischen, sondern deutlich seitlich neben den beiden Kernen der Zellwand an, der Phragmoplast war in diesem Falle funktionslos. Es entsteht somit nur ein *diploider* Dyadenergern. Läuft die Meiosis in dieser Zelle zu Ende, so werden nicht 4 haploide, sondern 2 diploide Gonen entstehen. Tatsächlich wurden PMZ gefunden, die einwandfrei die zweite meiotische Anaphase durchliefen, in denen aber nur eine Spindel vorhanden war. Sie war wesentlich breiter als eine normale Spindel und enthielt sämtliche Chromosomen der Zelle. Die Chromosomenzahl ließ sich nicht exakt feststellen, sie war aber wesentlich höher als 24.

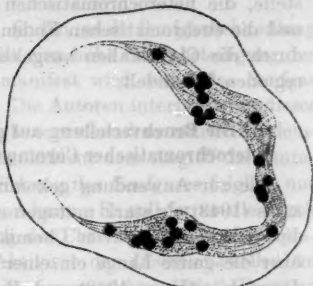


Abb. 4. Schmale, extrem langgestreckte Spindel nach Äthylurethan-KCl-Behandlung. (Fixiert 5 Tage nach Versuchsbeginn.)

D. Theoretischer Teil.

Die Auslösung und Analyse von Chromosomenmutationen ist im vergangenen Jahrzehnt Gegenstand zahlreicher Arbeiten gewesen. Es

sind jedoch für die Kräfte, die für die Bruchauslösung verantwortlich gemacht werden müssen, wie auch für den Mechanismus des Chromosomenbruches und der Rekombination noch keine befriedigenden Erklärungen gefunden worden. Die vorliegenden Untersuchungen sollen einen Beitrag zur Diskussion dieser Fragen liefern. Dabei gehen wir zunächst von der Tatsache aus, daß wir es bei *Solanum lycopersicum* mit einem Objekt zu tun haben, dessen Chromosomen partiell heterochromatisch sind und im Zusammenhang damit in der meiotischen Prophase 3 Regionen gut unterscheiden lassen, nämlich die Insertionsstelle, die heterochromatischen Mittelstücke beiderseits der Insertion und die euchromatischen Enden. Als erste Frage sei die Verteilung der durch die Chemikalien ausgelösten Brüche auf diese 3 Chromosomenregionen behandelt.

1. Die Bruchverteilung auf die verschiedenen Regionen partiell heterochromatischer Chromosomen nach Chemikalieneinwirkung.

Die zur Anwendung gekommenen Chemikalien wurden von OEHLKERS (1943) als stark mutagen erkannt. Frühere Untersuchungen über die Wirkungsweise von Chemikalien hinsichtlich der Bruchverteilung über die ganze Länge einzelner Chromosomen haben ergeben, daß bei *Drosophila* (VOGT 1948) und *Paeonia* (MARQUARDT 1949) das Chromosom in allen seinen Regionen den zur Anwendung gebrachten Chemikalien gegenüber gleichartig reagiert. Bei *Solanum lycopersicum* hingegen läßt sich eine starke Bruchbevorzugung der Insertionsstelle feststellen. 80,4% der Brüche wurden in der Insertion gefunden, während das Hetero- und Euchromatin nur mit 8 bzw. 11,6% bruchbeteiligt sind. Der Vergleich von Heterochromatin und Insertion ist dabei absolut sicher. Für dieses Verhalten sind zwei Erklärungsmöglichkeiten gegeben: Die Insertion kann speziell bei *Solanum lycopersicum* durch eine von der Norm abweichende chemische Struktur besonders bruchempfindlich sein. Diese Deutung ist wohl unwahrscheinlich, vielmehr möchten wir annehmen, daß die Insertionsstellen aller Objekte auf Grund ihrer übereinstimmenden Funktion auch den gleichen oder mindestens einen ähnlichen chemischen Aufbau besitzen. Eine andere Möglichkeit wäre die, daß die Empfindlichkeit der Insertionsstelle mit der partiell heterochromatischen Natur der Chromosomen von *Solanum lycopersicum* in Verbindung steht. Da das von MARQUARDT (1949) untersuchte Objekt *Paeonia* rein euchromatische Chromosomen besitzt, ist es sehr wahrscheinlich, daß die Unterschiede dieser beiden Objekte in der Reaktionsweise der Insertion gegenüber dem gleichen mutagenen Agens in der einerseits euchromatischen, andererseits partiell heterochromatischen Natur der Chromosomen zu suchen ist. Die Tatsache, daß VOGT (1948) für das stark heterochromatische X-Chromosom von

Drosophila eine gleichmäßige Bruchverteilung findet, widerspricht dieser Annahme nicht unbedingt, denn dieser Befund ist nur schwer mit unseren Untersuchungen vergleichbar, weil es sich bei diesen Arbeiten um zytologische Untersuchungen nur der lebensfähigen Mutanten handelt. Wenn der zwischen *Paconia* und *Solanum lycopersicum* konstatierte Unterschied bezüglich der Resistenz der Insertion auf die Heterochromasie unseres Objektes zurückzuführen ist, dann müßten sich nach Chemikalieneinwirkung an anderen partiell heterochromatischen Objekten analoge Befunde nachweisen lassen. Die entsprechenden Versuche sind in Vorbereitung.

DARLINGTON und KOLLER (1947) finden nach Senfgasbehandlung an *Tradescantia*-Chromosomen ebenfalls eine hohe Bruchbeteiligung der Insertionsstellen, die aber nur dann manifest wird, wenn das Senfgas auf Metaphasechromosomen einwirkt. Die Autoren interpretieren dieses Verhalten damit, daß die in der Metaphase vorhandene starke Nukleinsäureanlagerung die Chromosomenschenkel vor dem Angriff der mutagenen Substanzen schützt, daß die Wirkung des Senfgases folglich nur an der ungeschützten Insertion ansetzen kann. Es soll ferner die durch die Spindelbildung und die Einordnung der Chromosomen in die Äquatorialebene bedingte physiologische Aktivität der Insertionsstellen im Sinne einer Bruchförderung in diesen Regionen wirken. Diese Deutung läßt sich nicht ohne Einschränkung auf die Verhältnisse bei *Solanum lycopersicum* übertragen. Hier wurden die Brüche im prämeiotischen Ruhekern induziert, damit entfällt das Moment der physiologischen Aktivität der Insertionen. Die heterochromatischen Chromosomenregionen, die in prämeiotischen Ruhekernen in Form der Chromozentren vorliegen, weisen zwar bereits eine starke Nukleinsäureanlagerung auf, sie fehlt aber den langen euchromatischen Enden. Es müßte also bei einer Beeinflussung des Ruhekerns das stark entspiralisierte, durch Nukleinsäure nicht geschützte Euchromatin eine ähnliche Labilität zeigen wie die ebenfalls ungeschützte Insertion. Das ist jedoch bei *Solanum lycopersicum* nicht der Fall. Die Untersuchung gerade dieser Frage stößt auf starke methodische Schwierigkeiten, weil die langen euchromatischen Enden der Pachytänchromosomen schwer übersehbar sind. Für eine endgültige Beantwortung dieser Frage ist die Anzahl der im Euchromatin lokalisierten Brüche (169 Bruchstellen = 11,6% der Gesamtzahl) noch zu gering, die Untersuchungen am relativ kurzen Chromosom Nr. 11, das auch in seinen euchromatischen Regionen gut zu übersehen ist, beweisen jedoch, daß zwischen dem Bruchanteil von Insertion und Euchromatin sehr große, absolut gesicherte Differenzen vorhanden sind (Tabelle 2). Es ist also dringend notwendig, durch Bearbeitung weiterer Objekte festzustellen, ob den an *Solanum lycopersicum* ermittelten Befunden eine allgemeine Gültigkeit zukommt.

2. Der Vergleich von Chemikalien- und Röntgenwirkung auf partiell heterochromatische Chromosomen.

Der Vergleich von Chemikalien- und Röntgenwirkung hat an *Solanum lycopersicum* weitgehend übereinstimmende Befunde erbracht. Analoge Ergebnisse weisen eine Reihe von Autoren an anderen Objekten nach. Es sind in diesem Zusammenhang folgende Arbeiten zu nennen: DARLINGTON und KOLLER (1947), Röntgenstrahlen und Senfgas an *Allium* und *Tradescantia*; VOGT (1948), Röntgenstrahlen und Äthylurethan an *Drosophila*; OEHLKERS und MARQUARDT (1949), Äthylurethan an *Paeonia*; OEHLKERS und LINNERT (1949, 1951), Röntgenstrahlen, Äthylurethan und Alkaloide an *Oenothera*; OEHLKERS, LINNERT und STANGE (1951), Äthylurethan, Aluminiumchlorid und Alkaloide an *Oenothera*; MARQUARDT (1949), Putrescin an *Paeonia*; DEUFEL (1951), Röntgenstrahlen und Äthylurethan an den kleinen Chromosomen von *Vicia*. Die Ergebnisse an *Solanum lycopersicum* sind deswegen von besonderem Interesse, weil die Wirkungsweise der verwendeten Agenzien am Verhalten bestimmter, voneinander unterscheidbarer Chromosomenregionen getestet worden ist. Tatsächlich läßt sich beim Vergleich der Resistenz von Insertion, Hetero- und Euchromatin gegenüber der Röntgenbestrahlung und Urethan- bzw. Aluminiumchloridbehandlung zunächst an 2 besonders charakteristischen Chromosomen des Genoms eine volle Übereinstimmung der Wirkungsweise dieser 3 Agenzien feststellen. Das Auftreten eines gleichartigen Effektes in 3 chemisch unterscheidbaren Chromosomenregionen, hervorgerufen durch 2 verschiedenartige schädigende Prinzipien, wie sie Röntgenstrahlen und Chemikalien darstellen, läßt folgende Schlüsse zu:

a) Es müssen bestimmte Chromosomenloci besonders bruchempfindlich sein. Neben den hochempfindlichen Insertionsstellen aller Chromosomen von *Solanum lycopersicum* muß in diesem Zusammenhang auch die kurze euchromatische Region im heterochromatischen Mittelsegment des Chromosoms Nr. 11 genannt werden, der eine größere Labilität als den übrigen euchromatischen Regionen zukommen dürfte. Die Anzahl der in diesem Chromosomenabschnitt lokalisierten Brüche ist jedoch für eine endgültige Beurteilung noch zu gering.

b) Es muß auch der Wirkungsmechanismus der verschiedenartigen Agenzien, der zum Bruch und zur Rekombination führt, gleichartig sein. Diese Vorstellung wird aber am leichtesten verständlich, wenn wir als primären Vorgang eine zellphysiologische Störung annehmen, die einen nach Röntgen- und Chemikalienbehandlung gleichartigen physiologischen Zustand herbeiführt, der sich in übereinstimmender Weise störend auf die Chromosomenstruktur auswirkt. Wir schließen uns damit den Auffassungen MARQUARDTS (1950) und OEHLKERS' (1951) an.

Das Problem der Resistenz von Hetero- und Euchromatin gegenüber mutagenen Agenzien erscheint nach der vorliegenden Arbeit unter neuen Gesichtspunkten. Die vorjährigen Röntgenversuche hatten eine stärkere Bruchbeteiligung des Heterochromatins erbracht, es war aber auf die Schwierigkeiten, die der Vergleich der beiden Chromatinsorten in sich birgt, hingewiesen worden. Die schlechte Färbbarkeit des Euchromatins, vor allem aber die durch die langen euchromatischen Enden und die hohe Chromosomenzahl des Objektes bedingte Unübersichtlichkeit der Pachytänkerne haben zwangsläufig eine Vernachlässigung des Euchromatins zur Folge. Exakte Aussagen können am vorliegenden Objekt tatsächlich nur für den Vergleich Heterochromatin-Insertion gemacht werden. Um nun auch an Heterochromatin und Euchromatin zuverlässige Untersuchungen vornehmen zu können, wurde in den diesjährigen Chemikalienversuchen, nachdem die Anfärbung des Euchromatins verbessert worden war, ein besonders charakteristisches, relativ kurzes Chromosom des Genoms als Einzelchromosom untersucht. Hierbei ergab sich für Hetero- und Euchromatin eine gleichmäßige Bruchverteilung, es hat also den Anschein, als reagierten die beiden Chromatinsorten gleichartig auf die angewandten mutagenen Agenzien. Da die Auswertung des gesamten Genoms nach Chemikalieneinwirkung die gleichen Ergebnisse brachte, kann dieser Befund wohl als gesichert betrachtet werden. Er deckt sich nicht mit den Ergebnissen der vorjährigen Röntgenversuche, in denen eine stärkere Bruchbeteiligung des Heterochromatins gegenüber dem Euchromatin festgestellt wurde. Es läßt sich an Hand der vorliegenden Untersuchungen nicht entscheiden, ob diese statistisch gesicherten Differenzen zwischen Chemikalien- und Röntgenwirkung tatsächlich vorhanden oder ob sie durch die objektbedingten Schwierigkeiten der Untersuchungsweise zustande gekommen sind. Die einzigen Befunde, die über einen Vergleich der Resistenz von Hetero- und Euchromatin bisher vorliegen, sind von BAUER (1939) und PROKOFIEWA-BELGOVSKAJA (1939) an *Drosophila* erhalten worden. Die genannten Autoren weisen nach Röntgenbestrahlung eine stärkere Bruchbeteiligung des Heterochromatins nach und kommen damit zu den gleichen Ergebnissen, die wir nach Bestrahlung von *Solanum lycopersicum* erhalten haben (GOTTSCHALK 1951). MARQUARDT (1951) hat an *Oenothera* die Wirkungsweise von Röntgenstrahlen und Zephirol auf die hetero- und euchromatischen Chromosomenregionen untersucht. Er findet nach Bestrahlung eine Häufung der Brüche in der Zentromerregion, ähnliche Verhältnisse scheinen auch nach Zephiroleinwirkung vorzuliegen. Für einen Vergleich von Hetero- und Euchromatin ist jedoch die Anzahl der lokalisierten Bruchstellen zu gering.

In der Literatur finden sich nur in wenigen Arbeiten Differenzen zwischen der Wirkungsweise von Chemikalien und Röntgenstrahlen.

FORD (1949) weist in *Vicia*-Mitosen starke Unterschiede in der Bruchverteilung nach γ -Bestrahlung und Senfgasbehandlung nach. Ebenfalls bei *Vicia* findet DEUFEL (1951) in bezug auf die Bruchverteilung im Satellitenchromosom geringe Differenzen zwischen Röntgen- und Äthylurethanbehandlung. Schließlich sind noch Untersuchungen von AUERBACH (1950) an *Drosophila* zu nennen, in denen neben einer Reihe geringfügiger Differenzen vor allem ein niedriger Prozentsatz von Translokationen nach Senfgasbehandlung gegenüber den Röntgenwerten zu konstatieren ist. Nach den Untersuchungen an *Solanum lycopersicum* muß hier also noch die Möglichkeit einer verschiedenartigen Resistenz von Hetero- und Euchromatin gegenüber der Röntgen- und Chemikalienbehandlung angeschlossen werden, die jedoch an günstigeren heterochromatischen Objekten bestätigt werden muß.

Die Untersuchungen über das Zahlenverhältnis von normalen PMZ und Kernen mit Chromosomenmutationen, die im Anschluß an die Chemikalienbehandlung im Pachytän von *Solanum lycopersicum* angestellt wurden, erbrachten eine hohe Empfindlichkeit des Objektes gegenüber dem Äthylurethan-KCl-Gemisch und dem $AlCl_3$, die ohne Zweifel höher ist als gegenüber einer Röntgendosis von 500 r. Diese Befunde stimmen mit den Beobachtungen von OEHLKERS (1943, 1951) an *Oenothera* überein. Der Vergleich der Wirksamkeit von Äthylurethan und $AlCl_3$ erbringt bei den am hiesigen Institut untersuchten Pflanzen verschiedene Ergebnisse: OEHLKERS (1943) stellt bei *Oenothera* eine erheblich höhere Wirksamkeit des Äthylurethan-KCl-Gemisches gegenüber dem $AlCl_3$ fest; bei Verwendung verschiedener Konzentrationen von $AlCl_3$ wurde bei gewissen, sehr niedrigen Konzentrationen ein Maximum der Wirkung erzielt. Wurzelspitzen von *Vicia faba* reagieren nach DEUFEL (1951) hingegen stärker auf $AlCl_3$ als auf Äthylurethan KCl-Behandlung. Bei *Solanum lycopersicum* erbrachte die Verwendung von m/50 $AlCl_3$ ebenfalls eine um mehr als das Doppelte höhere Mutationsrate als das m/20 Äthylurethan in Kombination mit m/200 KCl; und höhere $AlCl_3$ -Konzentrationen erwiesen sich als wesentlich wirksamer als niedere. Die Empfindlichkeit der Versuchspflanzen gegenüber diesen beiden Chemikalien scheint also objektverschieden zu sein.

Der stark mutagenen Wirkung des Aluminiumchlorids könnte insofern Bedeutung zukommen, als das Aluminium ein Spurenelement des pflanzlichen Organismus ist und sich in Form seiner Verbindungen in großer Menge auf der Erdoberfläche vorfindet. Es besteht somit die Möglichkeit, daß die von der Pflanze aufgenommenen Aluminiumverbindungen einen Anteil an der Auslösung spontaner Mutationen haben.

Zusammenfassung.

1. Es wird die mutagene Wirkung von Äthylurethan und Aluminiumchlorid am Pachytän von *Solanum lycopersicum* getestet. Nach der Auswertung von 1463 lokalisierten Brüchen wird eine hohe Empfindlichkeit der Insertionsstelle gegenüber den verwendeten Chemikalien festgestellt. Für Hetero- und Euchromatin ergibt sich eine gleichmäßige Bruchverteilung.

2. Der Vergleich zwischen Röntgen- und Chemikalienwirkung erbringt an 2 besonders charakteristischen Chromosomen des Genoms hinsichtlich der aufgetretenen Konfigurationstypen und der Bruchverteilung eine weitgehende Übereinstimmung der beiden Agenzien.

3. Der zahlenmäßige Anteil der Kerne mit echten Chromosomenumbauten an der Gesamtzahl der analysierten PMZ liegt nach der Verwendung eines Äthylurethan-KCl-Gemisches bei 14,5%, nach m/50 Aluminiumchlorideinwirkung sogar bei 41%. Damit übersteigt die Mutationsrate der zur Anwendung gebrachten Chemikalien die Wirkung einer Röntgendosis von 500 r auf *Solanum lycopersicum* um das Mehrfache.

Literatur.

- AUERBACH, CH.: Chemical production of mutations. *Nature* (Lond.) **157**, 302 (1946). — Chemical mutagenesis. *Biol. Rev.* **24**, 355 (1949). — Differences between effects of chemical and physical mutagens. *Publ. Staz. Zool. Napoli* **22**, 1 (1950). — BAUER, H.: Röntgenauslösung von Chromosomenmutationen bei *Drosophila melanogaster*. I. *Chromosoma* **1**, 343 (1939). — DARLINGTON u. KOLLER: The chemical breakage of chromosomes. *Heredity* **1**, 187 (1947). — DEUFEL, J.: Untersuchungen über den Einfluß von Chemikalien und Röntgenstrahlen auf die Mitose von *Vicia faba*. *Chromosoma* **4**, 239 (1951). — FORD: Chromosome-breakage in nitrogen-mustard treated *Vicia faba* root tip cells. VIIIth internat. Congr. Genetics S. 570. 1949. — GEITLER, L.: Schnellmethoden der Kern- und Chromosomenuntersuchung. Berlin 1942. — GOTTSCHALK, W.: Untersuchungen am Pachytän normaler und röntgenbestrahlter PMZ von *Solanum lycopersicum*. *Chromosoma* **4**, 298 (1951). — LINNEET, G.: Die Bestimmung des Zeitpunktes für das Auftreten von Chromosomenmutationen in der Meiosis von *Oenothera* nach experimenteller Einwirkung. *Z. Abstamm.lehre* **83**, 414 (1950). — Die Einwirkung von Chemikalien auf die Meiosis. *Z. Abstamm.lehre* **83**, 422 (1950). — MARQUARDT, H.: Quantitative Auswertung eines Versuches zur Auslösung von Chromosomenmutationen durch ein Äthylurethan-KCl-Gemisch. *Experientia* **5**, 443 (1949). — Mutationsauslösung durch Putrescin-Hydrochlorid und Kaltextrakt aus überalterten *Oenothera*-Samen. *Experientia* **5**, 401 (1949). — Neuere Auffassungen über einige Probleme aus der Pathologie der Kernteilung. *Naturwiss.* **37**, 416, 433 (1950). — Die Auslösung von Chromosomenmutationen durch Röntgenstrahlen und durch die Invertseife Zephirol in der Meiosis von *Oenothera Hookeri*. *Z. Abstamm.lehre* **83**, 513 (1951). — OEHLKERS, F.: Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. *Z. Abstamm.lehre* **81**, 313 (1943). — Weitere Versuche zur Mutationsauslösung durch Chemikalien. *Biol. Zbl.* **65**, 176 (1946). — Mutationsauslösung durch Chemikalien.

Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss. 1949. — OEHLKERS u. LINNERT: Neue Versuche über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. Z. Abstamm.lehre 83, 136 (1949). — Weitere Untersuchungen über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. Z. Abstamm.lehre 83, 429 (1951). — OEHLKERS, LINNERT u. STANGE: Die Häufigkeit experimentell durch Röntgenstrahlen und Chemikalien induzierter Chromosomenumbauten auf den unterscheidbaren Anteilen der *Oenothera*-Genome in der Meiosis. Z. Abstamm.lehre 83, 479 (1951). — OEHLKERS u. MARQUARDT: Die Auslösung von Chromosomenveränderungen durch Injektion wirksamer Substanzen in die Knospen von *Paeonia tenuifolia*. Z. Abstamm.lehre 83, 299 (1950). OHLENDORF, A.: Untersuchungen zur Zytologie und Physiologie der Meiosis an *Solanum lycopersicum* und *Solanum tuberosum*. Diss. Freiburg 1944. — STANGE, L.: Untersuchungen über den Einfluß von Begleitfaktoren auf die mutationsauslösende Wirkung der Röntgenstrahlen. Z. Abstamm.lehre 83, 485 (1951). — VOOR, M.: Mutationsauslösung bei *Drosophila* durch Äthylurethan. Experientia 4, 68 (1948).

From the Medical Department, Osaka University, Osaka, Japan.

THE MICROSTRUCTURE AND ORIGIN OF THE THREADLIKE BODIES ISOLATED FROM THE METABOLIC NUCLEUS.

By

G. YASUZUMI, G. MIYAO, Y. YAMAMOTO and J. YOKOYAMA.

With 13 figures in the text.

(Eingegangen am 21. Februar/6. April 1951.)

Introduction.

Fundamental problems of nuclear structure have proved difficult to solve with the classical methods of light microscopy, because colloidal organization of nucleus is extremely sensitive to chemical agents, and also the light microscope has its limited resolving power. Only successful application of the electron microscope can elucidate the details lying beyond the light microscope's resolution. Much work has been done on the threadlike bodies isolated from metabolic nuclei during the last few years with the help of electron microscopes (HOVANITZ 1947, CALVET, SIEGEL and STERN 1948, HOVANITZ, DENUES and STURROCK 1949, LAMB 1949, and YASUZUMI 1951). It is not possible here to give a detailed account of the previous studies in this field, but a brief summary and discussion has already been attempted by YASUZUMI (1951).

The present paper is an account of our experiments and conclusions concerning the structural details and origin of the threadlike bodies isolated from metabolic nuclei. While we believe that these experiments carry our knowledge of the microstructure of the metabolic nucleus a good deal further, it is clear that much more work remains to be done before anything like a complete picture of the metabolic nucleus can be given.

Materials and Methods.

All the experiments to be described were carried out on the threadlike bodies isolated from erythrocyte nuclei of the tortoise *Clemmys japonica*. The threads were isolated in buffered physiological saline in a Waring blender at 3° C., which procedure consists essentially of a physical destruction of the cells, and a series of fractionations by centrifugation. We chose tortoise erythrocyte nuclei as material for these investigations, because the threads are comparatively resistant to the mechanical agitation. These threads are not so opaque to the electron beam as those of many other species, thus a detailed examination has been possible. The experiments on blood cell nuclei such as rabbit, guinea-pig, cock, domestic duck and toad showed that the threads are extremely sensitive to physical agents, and opaque to the electron beam of the energy of 6×10^4 electron-volts.

The separated, fresh (unfixed) threads were mounted on formvar substrates and shadowed with chromium. A Shimadzu electron microscope of the magnetic SM-1A type was used in this experiment.

Results.

We shall describe the results from the analyses of reproductions of electron micrographs. While the conclusions are based on detailed

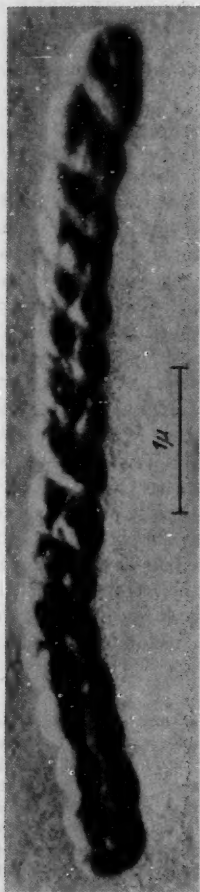


Fig. 1.

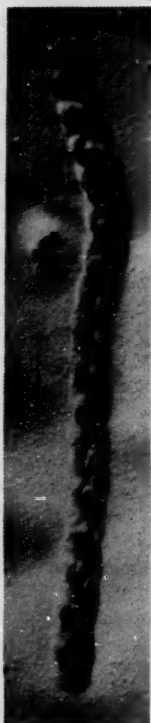


Fig. 2.



Fig. 3.

examination and measurement of almost five hundred plates, only a few reproductions can of course accompany the text.

In the first series of experiments we have inspected the fine structure of the threads themselves without separating them into their constituent

elements. This survey clearly indicates the unique spiral organization which we can only expect to find in the threads with the help of an electron microscope. Fig. 1—4 represent whole or fragmented threads of various sizes and degrees of spiralization. The whole threads are about 0.2 to 0.5μ wide, and 6μ or longer in length. In the lower part of Fig. 1 the thread appears to be relationally coiled, while in the other part it seems to be composed of two spirals running parallel to the

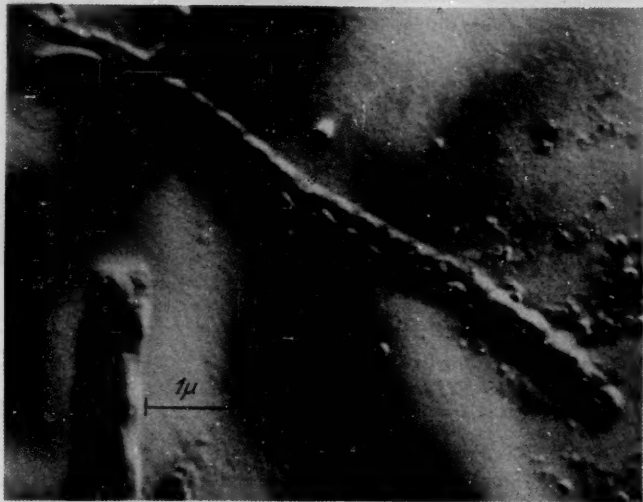


Fig. 4.

Fig. 1, 2, 3 and 4. Whole and fragmented threads showing a pair of chromonemata which form a double-stranded spiral.

longitudinal axis. In Fig. 2 the thread clearly consists of a double-coiled spiral in which the major spiral is double-stranded. The thread shows a longitudinal groove as can be seen in the middle part of Fig. 4. In Fig. 3 the surface of each spiral looks rough. If the threads mentioned above have a spiral structure in common, it illustrates the fact that the threads are constructed of a double-coiled spiral in which the major spiral is double-stranded, as YASUZUMI (1951) has already demonstrated in human and carp erythrocyte nuclei. The presence of relatively homogeneous kalymma, which closely envelops the chromonemata, would obscure the double-coiled spiral nature of all strands. The rough or groove-like appearance of the surface of coils seems to be an artifact produced by shrinkage from drying.

Fig. 5 and 6 represent a number of semilunar or irregular shaped bodies which are totally opaque to the electron beam, the diameter of the bodies being about 0.6 to 1.2μ ; these proved to be chromatin granules, because analysis with an ordinary refractive microscope makes it certain that such granules are stained with Feulgen's reagent and methyl green. These chromatin granules are easily removed from the threads. The chromatin granules are found, as a rule, at the end of the isolated threads as shown in Fig. 7. Here the surface of the body appears rough. From the shadowing angle and the length of the shadow

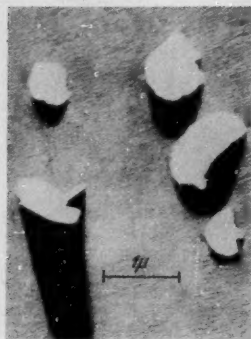


Fig. 5.

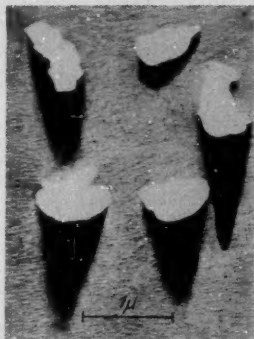


Fig. 6.

Fig. 5 and 6. Isolated chromatin granules.

it may be suggested that the opaque body occupying the end of the thread is an aggregate composed of a multitude of chromatin granules.

In a second series of experiments we have sought electron microscopic evidence concerning the nature of the kalymma. Fortunately, we have obtained microphotographs permitting the identification of this structure. Fig. 7 indicates that the kalymma is a homogeneous membrane enclosing the chromonemata. The kalymma is not easily demonstrated in electron micrographs, especially when it closely envelops the much denser chromonemata. The presence of a kalymma will be confirmed only by adequate drying and shadowing of the specimen. Each chromonema has also its own kalymma (Fig. 8).

YASUZUMI (1951) called the substance imbedding the threads from human and carp blood cell nuclei the matrix. We prefer now to designate the membrane, enclosing the thread, as kalymma, and to use the term "chromonema kalymma" to describe the sheath of a single chromonema.

In a third series of experiments separation of the thread into its component parts has been attempted by treating the material in a

Waring blender for one hour. The kalymma is easily removed from the thread and the constituent chromonemata of the thread appear coiled,



Fig. 7.

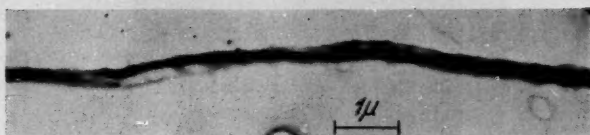


Fig. 8.

Fig. 7. An aggregated body composed of a multitude of chromatin granules, occupying the end of the thread at the left upper part of the Figure. Homogeneous kalymma enclosing the chromonemata at the left part of the Figure. A pair of chromonemata separated from the kalymma.

Fig. 8. Chromonema kalymma enclosing a single chromonema.

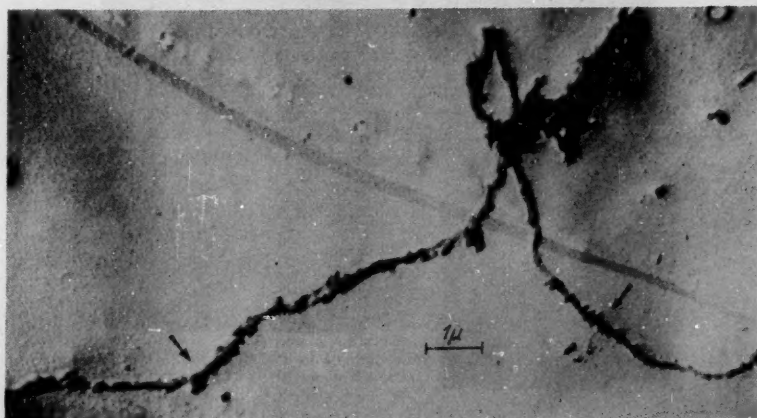


Fig. 9. Chromonema consisting of a twisted pair of fibrils.

several systems of spiralization being detectable. As YASUZUMI (1951) has already described, the thread is composed of a pair of chromonemata

and each chromonema consists of two fibrils twisted around each other. Such twisting can be seen in Fig. 9 and 11 at the points marked by arrows. The apparent width of each fibril is about $80\text{ m}\mu$. Fig. 10

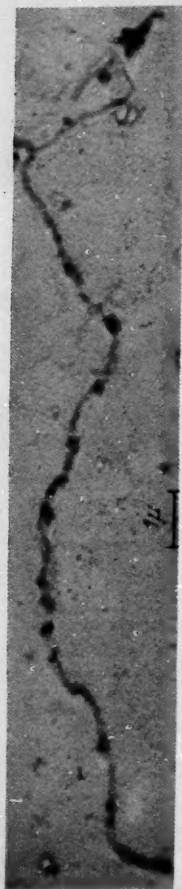


Fig. 10. Separated fibril.

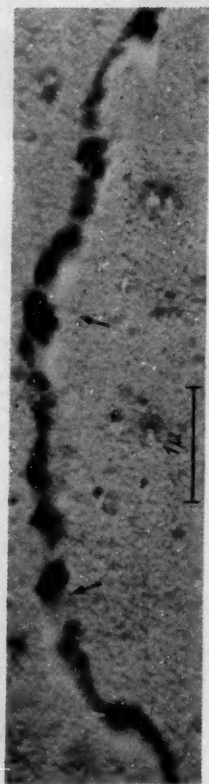


Fig. 11. Enlargement of part of Fig. 10, to show the finer structure of the fibril.

represents an unusually good example of a separated fibril, part of which is shown further enlarged in Fig. 11. A close examination of fibrils reveals their spiral structure. We believe that such a structure is produced by the coiling of a fine fibril to form long helices.

The partial separation of the filamentous constituents has been performed successfully by Waring blender treatment for 70 to 90 minutes. The constituent fibrils of the chromonema can be seen to consist of

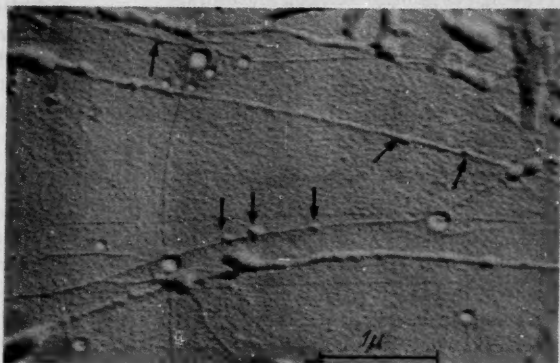


Fig. 12.

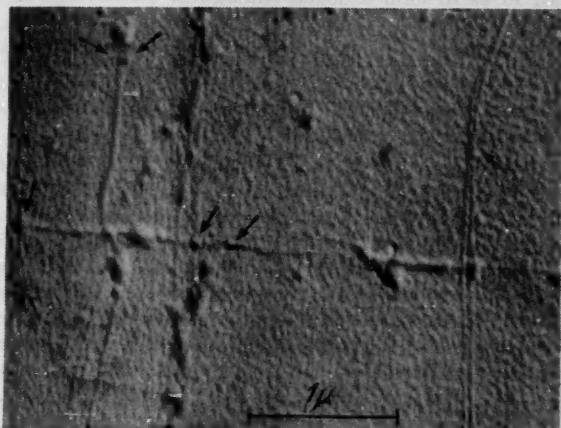


Fig. 13.

Fig. 12 and 13. Chromofilaments of approximately $20\text{ m}\mu$ in diameter and fine nodules with a range of 15 to $40\text{ m}\mu$ in diameter. Arrows indicate fine nodules.

sub-units or filaments of approximately $20\text{ m}\mu$ in diameter (Fig. 12 and 13).

YASUZUMI (1951) has used the term "chromofibril" for the fibrillar sub-units. But, "chromofilament" seems to be a better term than

"chromofibril". In view of the much more detailed information now available we consider it better to use the term fibre, fibril, and filament to describe the successive stages of sub-division.

As is clear from Fig. 12 and 13 the chromofilaments can be especially well seen in partially disintegrated fibrils. Perhaps their most striking feature is an apparent non-uniformity in diameter. They are differentiated in nodules of various sizes (comp. arrows in figs. 12 and 13) and in fine connecting filaments. The apparent diameter of the nodules is about 15 to 40 $m\mu$.

Discussion.

Previous studies of, and opinions on, the threadlike bodies isolated from various cell nuclei have been briefly summarized by YASUZUMI (1951) according to whom they are composed of the chromatin granules and chromatin threads, each of the latter ones consisting of a pair of chromonemata. In metabolic nuclei DNA is kept in store at the chromatin granules, while the chromonemata are free, or at least contain little, of it. Moreover, it has been found that the chromonemata are appressed so as to form a double-stranded or pseudosingle-stranded spiral which frequently gives the appearance of a triple helix, and that each chromonema is again multiple, consisting of at least four chromofibrils of approximately 5 to 10 $m\mu$ in diameter.

Our photographs support the findings of YASUZUMI illustrating in more details the aforesaid composition.

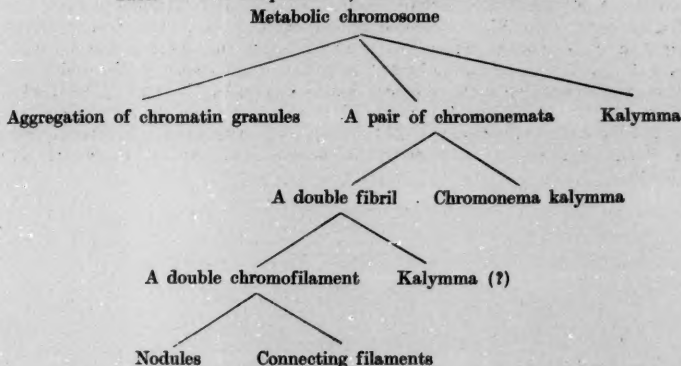
The well-defined threads composed of a pair of chromonemata apparently resemble in size, appearance and structure the chromosomes in telophase. Even if in electron microscopic observations we cannot estimate the number of the threads per nucleus, nor trace them to the prophase chromosomes, nevertheless, in view of the evidence of the continuity of chromosomes from one mitosis to another, we consider it, with some justice, appropriate to use the term "metabolic chromosomes" to describe the threadlike bodies isolated from the metabolic nucleus.

In the more detailed studies presented here, a longitudinal differentiation has been observed in the chromofilaments which are composed of fine nodules of various sizes and fine connecting filaments. As biologists we are interested in visualizing the structural equivalent in which genetic reactions are centered. Assuming that the genes are found in the chromosome as morphological units with a range of 10 to 20 $m\mu$ in diameter at maximum (GOWEN and GAY 1933, and MULLER 1935), the nodules, being 15 to 40 $m\mu$ in diameter, observed in the chromofilaments presumably correspond to the elementary genetic units. If

the genes occupy a small fraction of the volume of nodules, then the real size of the elementary genetic unit would be correspondingly smaller.

It is possible to illustrate the composition of the metabolic chromosome isolated from the erythrocyte nuclei of tortoise as follows (Table 1):

Table 1. *The composition of the metabolic chromosome.*



The observations recorded in the present paper may serve as a starting point for clarifying the problem of the relationship which exists between metabolic chromosomes and chromosomes in division stages. The microstructure of mitotic chromosomes of somatic cells will be described in another paper in the near future.

Summary.

Shadowed electron micrographs show many details of the fine structure of threadlike bodies isolated from tortoise erythrocyte nuclei (comp. table 1). We consider it more appropriate to use the term "metabolic chromosome" to describe the threadlike bodies.

Assuming that the genes are found in the chromosome as morphological genetic units the nodules observed in the chromofilaments or a fraction of them presumably correspond to the genes.

Acknowledgements.

We wish to express our sincere thanks to Prof. T. TOMITA, Prof. T. KASAI and Mr. A. TANAKA for their valuable advice and help in the course of this work. One of us (G. Y.) is indebted to the Scientific Research Fund of the Ministry of the Education.

Literature cited.

CALVET, F., B. SIEGEL and K. G. STERN: Electron optical observations on chromosome structure in resting cells. *Nature (Lond.)* **162**, 305 (1948). — CLAUDE,

- A., and J. S. POTTER: Isolation of chromatin threads from the resting nucleus of leucemic cells. *J. of exper. Med.* **77**, 345 (1943). — GOWEN, J. W., and E. H. GAY: Gene number, kind and size in *Drosophila*. *Genetics* **18**, 1 (1933). — HOVANITZ, W.: An electron microscope study of isolated chromosomes. *Genetics* **32**, 500 (1947). — HOVANITZ, W., A. R. T. DENUES and R. M. STURROCK: The internal structure of isolated chromosomes. *Wasmann Collector* **7**, 233 (1949). — LAMB, W. G. P.: Chromatin threads from cell nuclei. *Nature (Lond.)* **164**, 109 (1949). — MIRSKEY, A. E., and H. RIS: Isolated chromosomes. *J. gen. Physiol.* **7**, 1 (1947). — The chemical composition of isolated chromosomes. *J. gen. Physiol.* **7**, 7 (1947). — MULLER, H. J.: On the dimensions of chromosomes and genes in the dipteran salivary glands. *Amer. Naturalist* **69**, 378 (1935). — POLLISTER, A. W., and A. E. MIRSKEY: The isolation of chromosomes from resting nuclei. *Genetics* **28**, 86 (1943). — YASUZUMI, G.: The micro-structure of chromatin threads in the metabolic stage of the nucleus. *Chromosoma* **4**, 222 (1951). — YASUZUMI, G., Y. MIZUTA and Y. HASEGAWA: Electron microscopy of chromosomes. *Jap. J. Genet.* **25**, 45 (1950).

